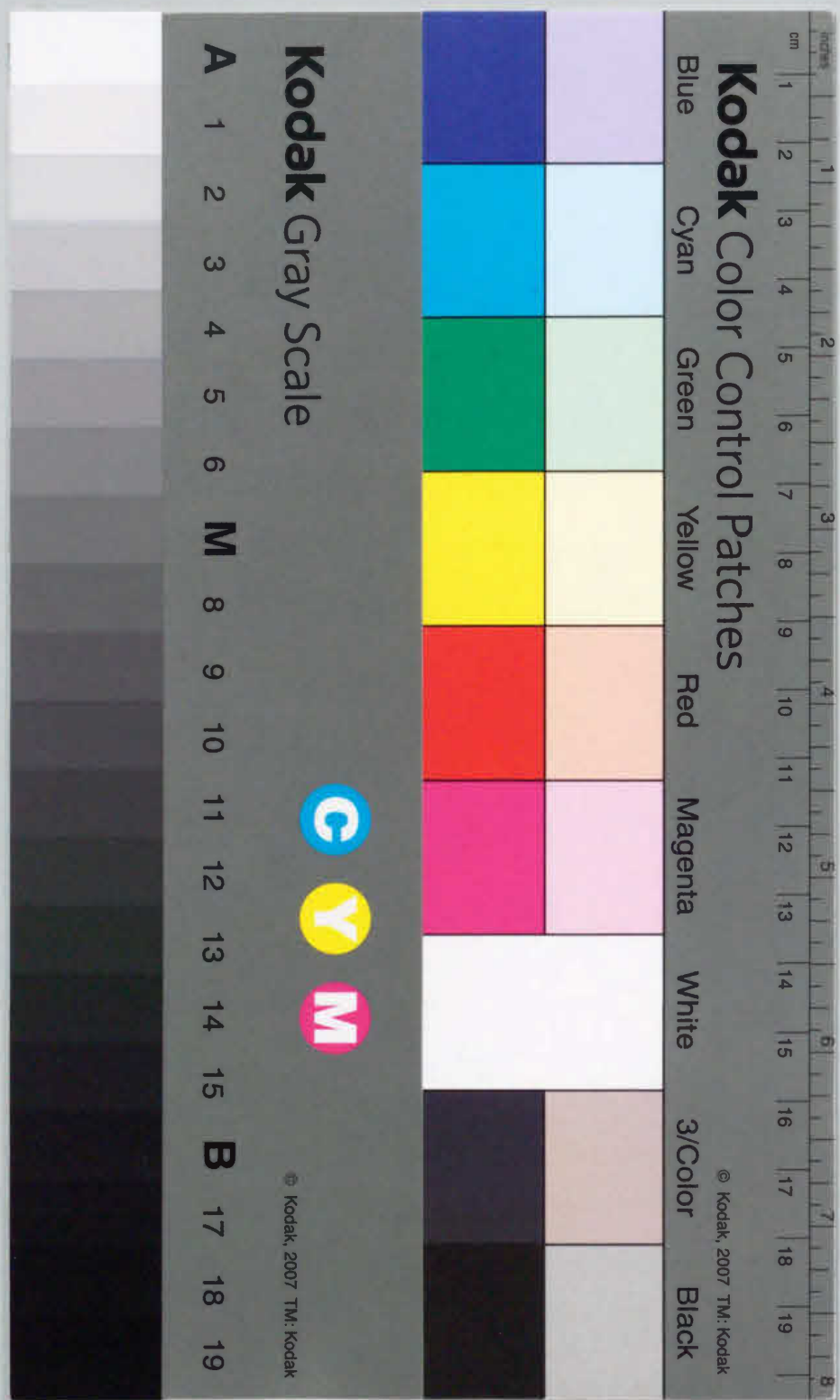


哺乳動物ミトコンドリアのバイオジェネシスに関する基礎研究

書 歴 履  
録 文 論  
旨 内 文  
要 容 論

樹 敏 田 姫



文部省高等教育局印刷局印刷

明治三十四年  
四月一日  
發行

明治三十四年

論 文 目 録

報 告 番 号	甲 案 第 63 号	氏 名	姫 田 敏 樹
学位論文題目		哺乳動物ミトコンドリアのバイオジェネシスに関する基礎研究	
<p><b>公刊論文</b></p> <p>Gene Expression of Subunit c(P1),Subunit c(P2),and Oligomysin Sensitivity Conferring Protein May Play a Key Role in Biogenesis of H<sup>+</sup>-ATP Synthase in Various Rat Tissues. Sangawa, H., Himeda, T., Shibata, H. and Higuti, T. <i>J. Biol. Chem.</i> 272. 6034-6037 (1997)</p> <p>Synchronized Transcriptional Gene Expression of H<sup>+</sup>-ATP synthase Subunits in Different Tissues of Fischer 344 Rats of Different Ages. Himeda, T., Morokami, K., Shibata, H., Arakaki, N. and Higuti, T. <i>Eur. J. Biochem.</i> 267 , 6938-6942 (2000)</p> <p><b>公刊参考論文</b></p> <p>Stoichiometry of subunit e in rat liver mitochondrial H<sup>+</sup>-ATP synthase and membrane topology of its putative Ca<sup>2+</sup>-dependent regulatory region. Arakaki, N., Ueyama, Y., Hirose, M., Himeda, T., Shibata, H., Futaki, S., Kitagawa, K. and Higuti, T. <i>Biochim. Biophys. Acta.</i> ( in press ) (2001)</p> <p><b>その他（総説・単行本等）</b></p> <p>Concerted Gene Expression and Master Factor In Molecular Architecture of Mammalian H<sup>+</sup>-ATP synthase. Higuti, T., Himeda,T., Koto, Y. and Morokami, K. <i>In Molecular Superstructure Design and Creation</i> (Kajiyama,T.,ed) pp362-366, Fukuoka (1998)</p> <p>ミトコンドリアのバイオジェネシスーその分裂と融合「新ミトコンドリア学」 姫田敏樹, 樋口富彦 (内海耕慥・井上正康 監修, 共立出版, 印刷中) (2001)</p> <p>V.A.2, mRNA の単離精製, V.A.3-a, 5'RACE 法による mRNA の 5' 末端領域の解析, V.A.3-b, 3'RACE 法による mRNA の 3' 末端領域の解析, V.B.3, mRNA の 絶対量の定量, V.E, Genetyx とゲノムネットによる遺伝子の解析, 姫田敏樹, 樋口富彦 V.C.1, CAT アッセイ, V.C.5, ゲルシフトアッセイ法, 武田京子, 姫田敏樹, 樋口富彦 V.D.4, サブトラクション法による生理機能に関わる遺伝子の解析, 新垣尚捷, 姫田敏樹 付録, 分子細胞生物学な関連したデータベースの有用なサーバ紹介, 姫田敏樹 分子細胞生物学基礎実験法改訂第 2 版 (堀尾武一 監修, 南江堂, 作製中)</p>			



論文内容要旨

報告 番号	甲 案 第 63 号	氏 名	姫田 敏樹
学位論文題目		哺乳動物ミトコンドリアのバイオジェネシスに関する基礎研究	
内容要旨			
<p>ミトコンドリアは、これまでラグビーボールあるいは葉巻状の形をしたもので、外膜とマトリックス内に入り込んだ内膜からなり、また、ある程度大きくなるとその中程に内膜の隔壁を形成して2分裂する方式でミトコンドリア数を増殖させると考えられてきた。しかし最近、全てのミトコンドリアが融合した網状体が観察されたり、クリステは内膜が単純に入り込んだものでないことが明らかにされてきたことから、長く保持されていたこれまでの絵図や説明が間違っていることが明かとなってきた。つまり、ミトコンドリアの研究は、その概念を改めて考察すべき時期を迎えたといえる。</p> <p>そこで本研究では、ミトコンドリアの中でも中心的な働きを担っているATP合成酵素と、心筋細胞においてミトコンドリアの異常な増殖が確認されるJVSマウス (Juvenile Visceral Steatosis mouse) に着目し、ミトコンドリアのバイオジェネシスの解明を目的として、以下の2つのテーマから解析を行った。</p> <p>1. ATP合成酵素の分子構築における分子シンクロナイゼーション現象の発見</p> <p>哺乳動物のミトコンドリアのATP合成酵素は16種のサブユニットが一定の化学量論比で構築された世界最小の分子モーターで、ATP合成反応を触媒する<math>F_1</math>と、エネルギー変換反応に携わる<math>F_0</math>、そしてこの2つのセグメントをつなぐstalkで構築されているが、これらを構成するサブユニットの発現制御機構は、いまだ明らかにされていない。そこで本研究では、ATP合成酵素の核遺伝子にコードされたサブユニットの転写レベルにおける制御システムを明らかにすることを目的とし、<math>F_0</math> stalkに属するサブユニット7種と<math>F_1</math>の<math>\beta</math> subunit、そして活性制御因子であるIF1 (ATPase inhibitor protein) の全9種について転写物量の解析を行った。その結果、これら9種のサブユニットのmRNAは大部</p>			



分心臓において最も多く発現しているが、これら mRNA の分子モル比は、脳・肝臓・心臓・腎臓の4種の臓器において、全く同一の割合で発現されていることが初めて明かとなった。この発現パターンは、2～90週齢ラットにおいても一定に保持されていることが明らかとなった。これは、ATP合成酵素サブユニットを一定の割合で発現するための、転写レベルでの分子シンクロナイゼーションシステム“ジーンシンクロナイザー”の存在を強く示唆している。

## 2. ミトコンドリアの分裂・融合・分配に関わる新規因子の探索

全身性カルニチン欠乏マウスである JVS マウスの心筋細胞では、ミトコンドリア数が細胞質の大部分を占めるほど劇的に増加していることが知られている。この事実、JVS マウスの心筋細胞では、ミトコンドリア数の増加を引き起こす制御因子が正常マウスのそれに比し極端に多く発現していることを示している。また、ATP合成酵素サブユニットの転写量および組織特異的発現パターンを調べたところ、JVS マウスと正常マウスとの間に違いは認められなかった。このことは、ミトコンドリアの増加にその構成成分の増減は伴っていないことを示しており、ミトコンドリアの増殖にはその構成成分の発現とは独立した増殖制御機構が存在することが示唆されてきた。

そこで、ミトコンドリア数の増加を引き起こす制御因子を明らかにするため、蛍光 Differential Display 法を用いて JVS マウスと正常マウスで発現している mRNA の差を解析した。その結果、現段階でミトコンドリアの増殖に関与する可能性のある新規遺伝子を6種得ることに成功した。これらの因子の完全長 cDNA クローニングを行なうとともに、これらの因子がミトコンドリアにどのような影響を及ぼすかを調べるために、ミトコンドリア輸送ペプチドを融合させた蛍光タンパク発現ベクターと共にこれらの DNA 断片を培養細胞中にトランスフェクトして、生細胞中におけるミトコンドリアの動態変化をタイムラプスデコンボリューション CCD 蛍光顕微鏡下で直接観察することを考え、その実験系を確立させた。

今後、哺乳動物のミトコンドリアの分裂・融合と娘細胞への分配の分子メカニズムが解明されることが期待される。

哺乳動物ミトコンドリアの  
バイオジェネシスに関する基礎研究

2001

姫 田 敏 樹



哺乳動物ミトコンドリアの  
バイオジェネシスに関する基礎研究

2001

姫 田 敏 樹





## 目 次

第1章 緒 言.....	1
第2章 H <sup>+</sup> -ATP 合成酵素の分子構築における 遺伝子制御の分子シンクロナイゼーション現象の発見	
2.1 諸 言.....	5
2.2 実験結果	
2.2-1 mRNA の定量法の開発.....	8
2.2-2 プローブの作製.....	9
2.2-3 <i>In Vitro</i> 転写システムを用いた mRNA の合成.....	10
2.2-4 Poly(A) <sup>+</sup> RNA の精製.....	11
2.2-5 ドットプロット法による mRNA の定量.....	12
2.3 考 察.....	17
2.4 実験方法	
2.4-1 実験動物.....	24
2.4-2 <i>In Vitro</i> 転写系による RNA の合成.....	24
2.4-3 組織からの mRNA の精製.....	24
2.4-4 ドットプロット法.....	25
2.4-5 ハイブリダイゼーション.....	25
2.5 参考文献.....	26

## 第3章 ミトコンドリアが異常増殖した JVS マウス心筋からの ミトコンドリアの分裂・融合と娘細胞への分配に関わる新規因子の探索

3.1 諸 言.....	33
3.2 実験結果	
3.2-1 H <sup>+</sup> -ATP 合成酵素の各サブユニット遺伝子の転写発現量の定量.....	37
3.2-2 JVS マウスの心臓における特異的発現遺伝子の検出.....	39
3.2-3 特異的発現遺伝子断片の抽出・精製.....	41
3.2-4 単離した特異的発現遺伝子断片のシーケンス決定.....	43
3.2-5 JVS マウス・正常マウスの心筋細胞由来 cDNA ライブラリーの作製.....	46
3.2-6 タイムラプスデコンボリューション CCD 蛍光顕微鏡 を用いたミトコンドリア観察系の確立.....	48
3.3 考 察.....	51
3.4 実験方法	
3.4-1 蛍光 Differential Display 法.....	53
3.4-2 2nd PCR および H.A.-Yellow による分離.....	53
3.4-3 シーケンス反応.....	53
3.4-4 cDNA ライブラリーの作製.....	54
3.4-5 pDsRed1-Mito vector の C2C12 細胞へのトランスフェクション.....	54
3.5 参考文献.....	55

## 第4章 総 括..... 59

謝 辞.....	63
----------	----



## 第1章 諸言

全ての生物は、生命維持に必要なエネルギー源として、太陽光・食物等からのエネルギーを、“エネルギー変換システム”において ATP という形に変換して貯蔵し、これを必要に応じて加水分解することによりエネルギーを得て生命活動を営んでいる。真核生物におけるエネルギー変換反応は、細胞体積の約 22 % (肝細胞で細胞当たり約 1,700 個) を占めるミトコンドリアの酸化的リン酸化反応で行われており、ここでエネルギー要求量の約 80% 以上がまかなわれている。

このミトコンドリアは、40 年前に電子顕微鏡写真が撮られて以来、1 ミクロン前後のラグビーボールあるいは葉巻状の形をしたもので、外膜とマトリックス内に入りくんだ内膜からなると、長い間考えられ教科書として定着していた。また、ミトコンドリアは、半自己増殖能を持っており、それ自身のゲノムと核のゲノムの支配のもとに成長し、ある程度大きくなると、細菌の場合と同様に、ミトコンドリアの中程に内膜の隔壁 (septum) を生じ、その後、2 分裂する方式でミトコンドリア数を増殖させると考えられてきた。しかし、最近、これらの長く保持されていた絵図や説明が間違っている可能性が示唆されてきた<sup>1,2)</sup>。

ミトコンドリアは、高度に動的なオルガネラで、セルサイクルの G1 - 期には全てのミトコンドリアが融合した cellular mitochondrion ともいうべき連続した網状体 (continuous reticulum) として観察され (図 1), そして S - 期にはより小さな管状体に断片化されることが観察されたのである<sup>3)</sup>。そこで、このようなミトコンドリアの種々の形態の制御において中心的な役割を担っている“分裂”と“融合”, そして娘細胞への“分配”のイベントが、現在の研究の最も活発なホットスポットとなっている。

ミトコンドリアの分布と動態は、ランダムではなくチューブリンや中間経フィラメント (intermediate filament) 等のサイトスケルトンと、キネシンやダイニンなどのオルガネラを輸送するモーター蛋白によってコントロールされていることが明らかとなっており<sup>4)</sup>、さらに、Rutter と Rizzuto は、ミトコンドリア外膜が、endoplasmic reticulum (ER) と結合しており、細胞内のカルシウムシグナリングにおいてミトコ



ンドリアがカルシウムレベルのレギュレータとして重要な役割を演じていると説明している<sup>5)</sup>.

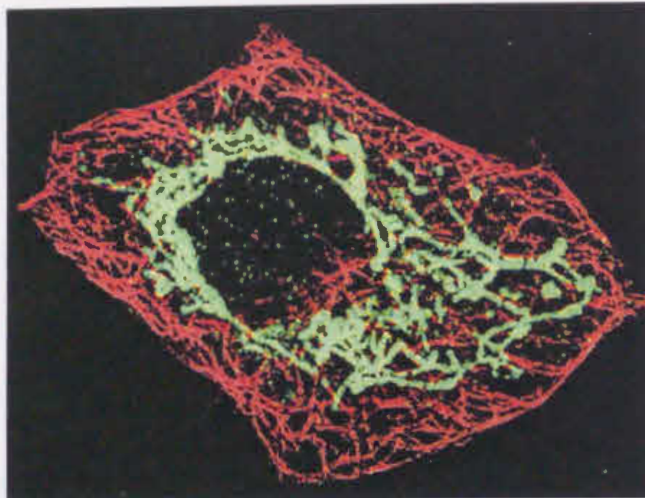


図1. 哺乳動物の線維芽細胞におけるミトコンドリア網状ネットワーク<sup>3)</sup>

COS-7 細胞のミトコンドリア (緑) と微小管 (赤) を、蛍光抗体法を用いた共焦点顕微鏡により観察した。ミトコンドリアは ATP 合成酵素の  $\beta$  サブユニットに対する抗体とローダミン標識した二次抗体を用いて蛍光標識された。微小管はチューブリンに対する抗体とフルオレッセンを結合した二次抗体を用いて蛍光標識された。

ミトコンドリアの網状構造体は、細胞内カルシウムのホメオスタシスだけでなく、エネルギー代謝においても重要な利点がある。すなわち、膜電位の細胞内ケーブルとして機能することにより、細胞内のある部分でエネルギーを生産し、そこは距離的に離れた部位で使用されることが可能であろう<sup>6)</sup>。

また、最近の電子線トモグラフィーの研究から、今までのミトコンドリア内の構造は単純化しすぎており、外膜と内膜間に多くの接続点があること、クリステは、内膜が単純に入り込んだものでなく、図2に示されるように、独自のコンパートメントを作っていることが明らかにされている<sup>7)</sup>。



図2. ニワトリ小脳のミトコンドリアの断片 3D トモグラムから作製されたコンピュータモデル<sup>7)</sup>

(左) ミトコンドリア内の全体像。  
(右) 代表的なクリステの4つのタイプが示されている。Quicktime ビデオが次のサイトで観察できる。

<http://www.sci.sdsu.edu/TFrey/MitoMovie.htm>

このように、これまで考えられていた様なミトコンドリアの形態やその動態についての概念は新しく書き換えられる時期を迎え、そしてミトコンドリア自体を改めて考察する必要が生じてきている。また、ミトコンドリアは、ミトコンドリア病をはじめ、糖尿病、アルツハイマー病、老化、アポトーシス、等の様々な疾患や生理的变化に関与していることでも良く知られており、さらに最近では、癌の診断にもミトコンドリア遺伝子が利用されるようになってきていることから、このミトコンドリアの分裂増殖の制御機構といったような基本的な生理反応を明らかにすることにより、上記疾患を筆頭に様々な疾患の治療に役立つ有用な情報が得られることが大いに期待できる。

そこで、本研究では、ミトコンドリアの中でも中心的な働きを担っている  $H^+$ -ATP 合成酵素と、心筋細胞においてミトコンドリアの異常な増殖が確認される JVS マウス (Juvenile Visceral Steatosis mouse)<sup>8)</sup> に着目し、ミトコンドリアのバイオジェネシスの解明を目的として、『 $H^+$ -ATP 合成酵素の転写レベルにおける発現制御機構の解明』と『JVS マウスにおけるミトコンドリア数の増加に関わる新規因子の探索』の2つのテーマから実験・考察を行った。 $H^+$ -ATP 合成酵素と JVS マウスの詳細については、各章で述べているので、ここでは省略する。



## 参考文献

- 1) 樋口富彦 (2000) 分子がつくるナノの不思議—切って集めたタンパク質—  
第14回「大学と科学」公開シンポジウム組織委員会編,  
pp.145-155, クバプロ出版
- 2) 姫田敏樹, 樋口富彦 (2001) ミトコンドリアのバイオジェネシス  
—その分裂と融合「新ミトコンドリア学」内海耕慥・井上正康監修,  
共立出版 (印刷中)
- 3) Yaffe, M. P. (1999) The machinery of mitochondrial inheritance and behavior.  
*Science* **283** 1493-1497
- 4) Setou, M. Nakagawa, T., Seog, D. H. and Hirokawa, N. (2000)  
Kinesin superfamily motor protein KIF17 and mLin-10 in NMDA receptor -  
Containing vesicle transport. *Science* **288**, 1796-1802
- 5) Rutter, G. A. and Rizzuto, R. (2000) Regulation of mitochondrial metabolism  
by ER  $\text{Ca}^{2+}$  release: an intimate connection. *Trends Biochem.Sci.* **25**, 215-221
- 6) Capaldi, R. A. (2000) The changing face of mitochondrial research.  
*Trends Biochem.Sci.* **25**, 212-214
- 7) Frey, T. G. and Mannella, C. A. (2000) The internal structure of mitochondria.  
*Trends Biochem.Sci.* **25**, 319-324
- 8) Koizumi, T. Nikaido, H., Hayakawa, J., Nonomura, A. and Yoneda, T. (1988)  
Infantile disease with microvesicular fatty infiltration of viscera spontaneously  
occurring in the C3H-H-2<sup>0</sup> strain of mouse with similarities to Reye's syndrome.  
*Lab. Anim.* **22**, 83-87

## 第2章 $\text{H}^+$ -ATP 合成酵素の分子構築における遺伝子制御の 分子シンクロナイズ現象の発見

### 2.1 諸言

酸化的リン酸化系は、ミトコンドリア内膜に存在し、85種のタンパク質がある特定の化学量論比で5種の複合体(I~V)に分子構築された超分子複合体である。これらの複合体のサブユニットのうち、複合体I, III, IV, Vに関わる13種のサブユニットはミトコンドリア遺伝子にコードされている(シトクロームb, シトクロームオキシダーゼのCO I, II, III, NADH 脱水素酵素のND1~6, ND4L,  $\text{H}^+$ -ATP 合成酵素の subunit a, A6L)<sup>1-7)</sup>(図2-1)。つまり、これら4つの複合体は、核遺伝子とミトコンドリア遺伝子の二重支配を受けていると推測される。NRFs (Nuclear Respiratory Factors)<sup>8-10)</sup> や、PGC-1 (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator 1)<sup>11)</sup>等は、この二重支配を協調的に制御するとされている因子であるが、その制御機構には、いまだ不明な点が多い。

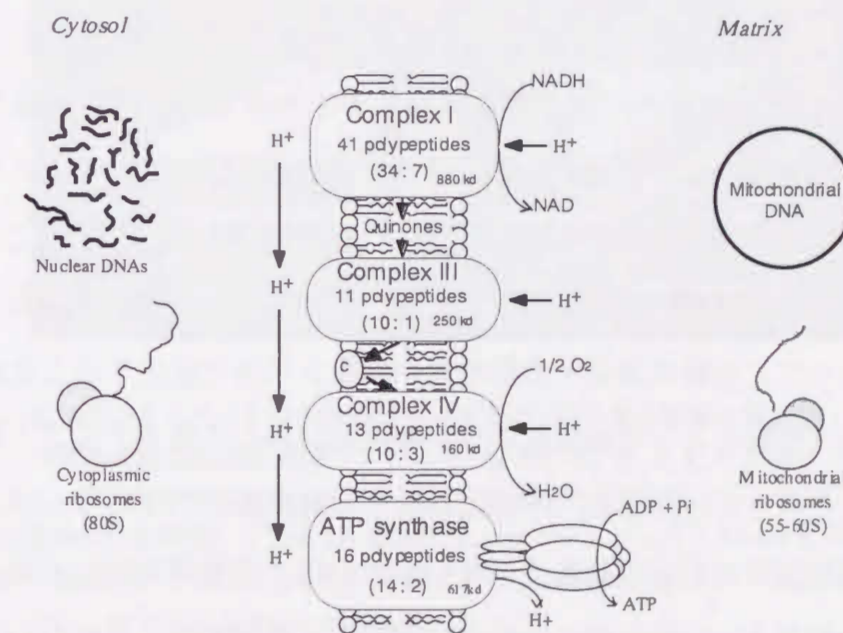


図2-1. ミトコンドリア内膜における酸化的リン酸化反応の模式図

酸化的リン酸化系の5つの複合体のうち上図に示した4つの複合体は、その各サブユニットが核遺伝子とミトコンドリア遺伝子に分かれてコードされている。その割合を(核遺伝子:ミトコンドリア遺伝子)で示した。



このような酸化的リン酸化反応の最終反応を司り、ミトコンドリア機能の中心的役割を担っているのが、史上最小の分子モーターともいわれる<sup>10)</sup>  $H^+$ -ATP 合成酵素である（図 2-2）。 $H^+$ -ATP 合成酵素は  $F_1$  と  $F_o$  と呼ばれる機能的に異なるセグメントとこの2つをつなぐ stalk 部分から構成された超分子複合体である。 $F_1$  はミトコンドリアの内膜から突出しているATP 合成反応の触媒部位であり、 $F_o$  はプロトン透過させる膜内の通過路でエネルギー変換反応に携わるセグメントである。 $F_1$  セグメントは、 $\alpha, \beta, \gamma, \delta, \epsilon$  と呼ばれる5つのサブユニットからなり、 $\alpha, \beta$  についてはその立体構造も Walker らのグループにより明らかにされ<sup>12)</sup>、Walker は 1997 年度のノーベル化学賞を Boyer と Skau らと共に受賞した。一方  $F_o$  セグメントと stalk 部分は、ラット<sup>2,7, 13-23)</sup> においては、subunit a, subunit b, subunit c, subunit d, subunit e, factor 6, OSCP (Oligomycin sensitivity conferring protein), A6L の8つのサブユニットから構成されていることが明らかとなっており、更に、ウシ<sup>24,25)</sup> については subunit f, subunit g の存在が、酵母<sup>26)</sup> については subunit f の存在が確認されている。これらの各サブユニットのストイキオメトリーは、 $F_1$  セグメントの  $\alpha, \beta, \gamma, \delta, \epsilon$  が 3:3:1:1:1 であり<sup>27,28)</sup>、 $F_o$  セグメントの b, d, e, factor 6, OSCP, A6L がそれぞれ 1.80, 1.10, 2.00, 2.00, 1.10, 1.00 (mol/mol  $F_1$ ) である<sup>4,29,30)</sup> ことが決定されている。このように、 $H^+$ -ATP 合成酵素はある定まったストイキオメトリーで構築されているわけであるが、転写レベルではいったいどのようなようになっているのだろうか。

細胞内の好氣的エネルギー供給は、短期的には呼吸調節能で、長期的にはミトコンドリア形成によって調節されている。例えば、ホルモンや解糖系の基質であるグルコース等によって、各酵素遺伝子の発現量が転写レベルで変化することが確認されており、また、加齢によっても酸化的リン酸化能は著しく低下することが知られている<sup>31-36)</sup>。こうしたことから、呼吸能を担う各酵素のサブユニットが、様々な条件においてどのような転写調節を受けているのかは、大変興味深いものとなってくる。また、加齢によって酸化的リン酸化能が著しく低下することについてはさらに、若い細胞の核と老化した細胞の細胞質を融合させたサイブリッド（細胞質雑種）では、老化細胞由来のミトコンドリアの呼吸能が完全に回復し、逆の組み合わせでは老化の様相を示すという報告がある<sup>12,36,37)</sup>。このことから加齢による酸化的リン

酸化能の著しい低下・細胞老化の鍵は核に存在すると考えられる。しかし、酸化的リン酸化の組織特異性やミトコンドリアに起因する脳障害や老化（加齢）といった生体エネルギー学的原因に基づく疾患の詳細については、ほとんど解明されていない。

そこで、本研究では  $H^+$ -ATP 合成酵素の核にコードされたサブユニットの、転写レベルにおける制御システムと、加齢に伴う mRNA 量の変化の解明を行うために、筆者らの研究室等でクローニングされたラットの subunit b<sup>17,18)</sup>, subunit c<sup>21,22)</sup>, subunit d<sup>23)</sup>, subunit e<sup>16)</sup>, factor 6<sup>19,20)</sup>, OSCP<sup>21)</sup> と  $F_1$ - $\beta$  subunit<sup>38)</sup>, そして ATP の浪費的な分解を防いでいる IF1 (ATPase inhibitor protein)<sup>21)</sup> の全9種について、その転写物量の解析を行った。

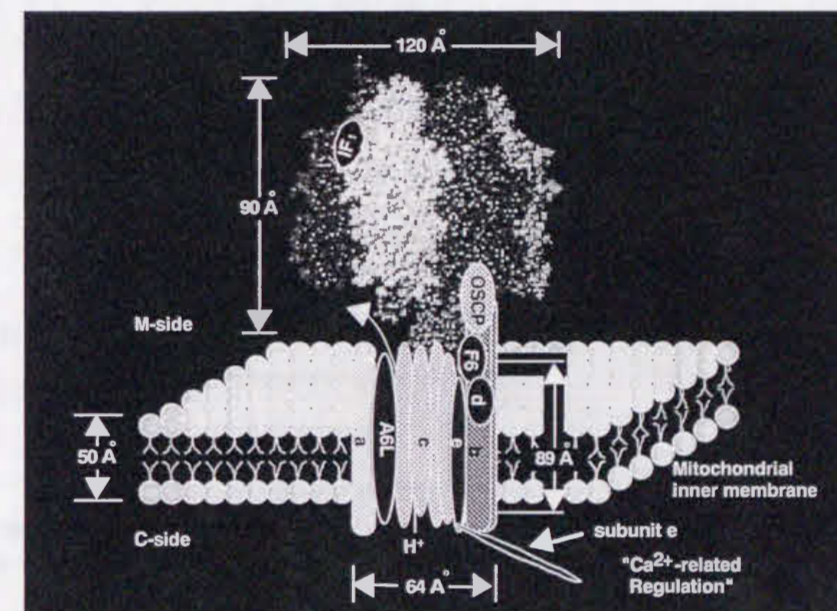


図 2-2 ミトコンドリア内膜に存在する  $H^+$ -ATP 合成酵素の模式図

本酵素の触媒部位を構築している  $F_1$  複合体は、 $\alpha, \beta, \gamma, \delta, \epsilon$  のストイキオメトリーで構築されており、その三次元的構造が決定されている。他方、エネルギー変換部位を構築している  $F_o$  複合体は、subunit a, b, c, d, e, Factor 6, OSCP, A6L から構築されている。そして、 $F_1$  複合体の  $\beta$  subunit に結合して活性制御を行っていると考えられる IF1 とから成る。



## 2.2 実験結果

### 2.2-1 mRNA の定量法の開発

T3<sup>39)</sup>, T7<sup>40)</sup>, SP6<sup>41)</sup> 等のバクテリオファージ由来の DNA 依存性 RNA polymerase に特異的なプロモーターの下流に組み込んだ目的 cDNA から, *in vitro* 転写システムを用いて mRNA を合成し, これを段階希釈して内部標準試料とし, 目的のサンプルの poly(A)<sup>+</sup>RNA と同時に一枚のメンブランにブロットングする. これをハイブリダイゼーションした後, 富士フィルムのイメージングアナライザー (BAS-1500) を用いて各シグナル強度を測定し, 内部標準試料のシグナル強度を基にした直線回帰により, 組織・細胞内に存在する mRNA の量を計算することにより, その mRNA の絶対量を 100 ng の mRNA 当たりの量 (pg/100ng poly(A)<sup>+</sup>RNA) として得ることに成功した. この方法の概略を図 2-3 に示す.

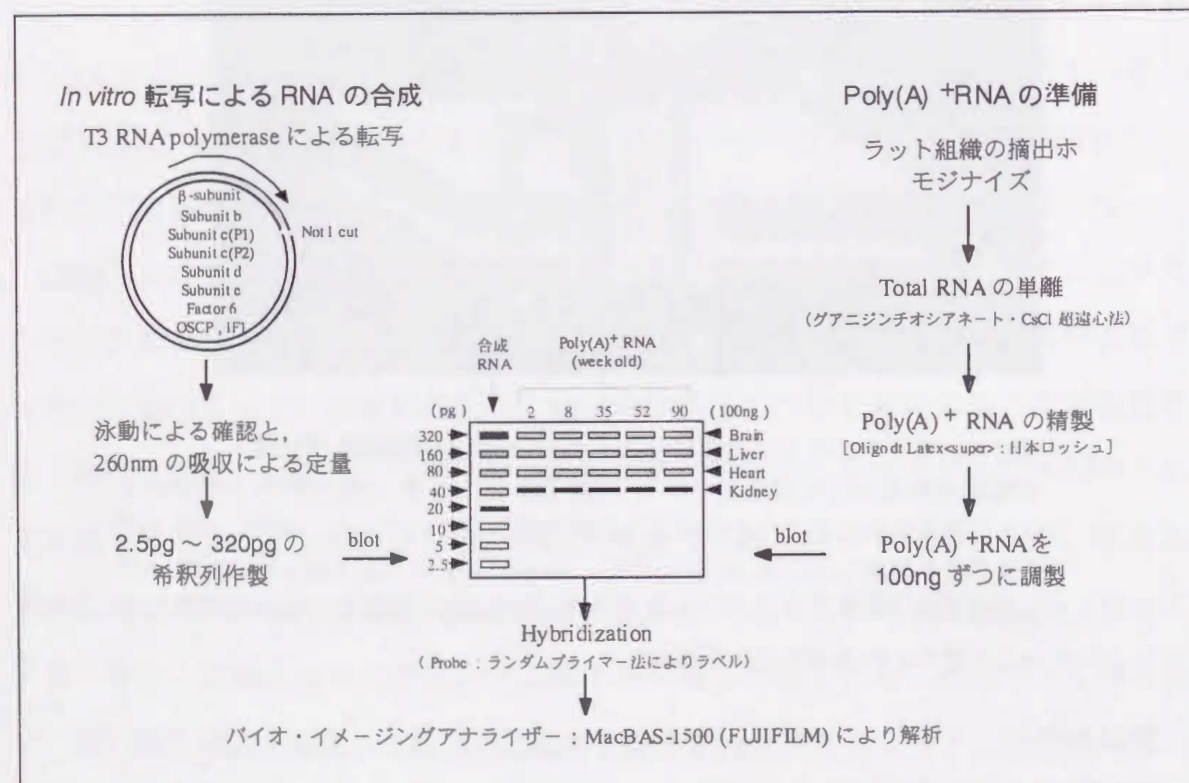


図 2-3 mRNA の絶対量の定量法の概要

### 2.2-2 プローブの作製

筆者らの研究室では, これまでラット H<sup>+</sup>-ATP 合成酵素の Fo セグメントの核にコードされた 7 つのサブユニットについて cDNA クローニングを行っており<sup>16-23)</sup>, 今回, 図 2-4 に示すような部位を切り出してプローブの鋳型とした. このうち subunit c については, シグナルペプチドの異なる 2 つのアイソフォームがクローニングされているので<sup>21)</sup>, 図 2-4 に示すとおり互いに配列の異なるシグナルペプチドをコードしている部位を用いた. 一方 F1-β subunit は, 配列<sup>38)</sup>の一部を Nested RT-PCR 法でクローニングすることにより得た 822-1113 のフラグメント (291bps) を用いた. これらは全て, シークエンスを行って塩基配列を確認後, 超遠心で精製したものを実験に用いた. このとき同時に, クローニングした各サブユニットに含まれる poly(A)<sup>+</sup>tail の A 残基の正確な数を明らかにした. 得られたフラグメントの [<sup>32</sup>P] によるラベルは, ランダムプライマー法により行った. 各プローブは 5 × 10<sup>5</sup> cpm/ml となるようにハイブリダイゼーションバッファーに加えた.

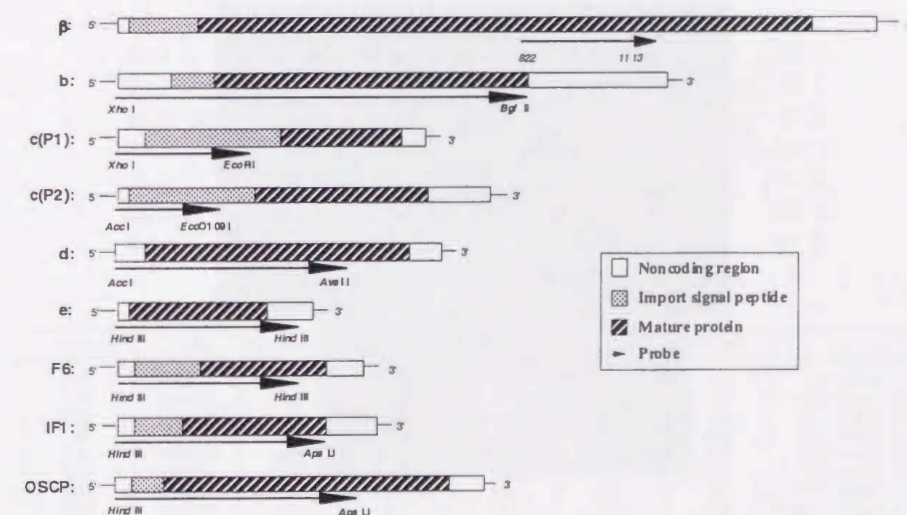


図 2-4 H<sup>+</sup>-ATP 合成酵素サブユニットの cDNA マップとプローブ DNA の構成

F1-β subunit は, Nested-RT PCR によりクローニングした断片を, 他のサブユニットは, cDNA から左に示す部位を切り出してプローブとした. これらの断片に対する放射ラベルは, [<sup>32</sup>P] dCTP を用いてランダムプライマー法により行った.



## 2.2-3 In Vitro 転写システムを用いた mRNA の合成

mRNA の絶対量を定量するため *in vitro* 転写システムを用いて Bluescript II KS<sup>+</sup> に挿入した各 cDNA から mRNA を合成し内部標準試料とした。これまで筆者らの研究室でクローニングされた全ての cDNA は、Bluescript II KS<sup>+</sup> の EcoRV-Not I site に正順位で挿入されているので、Not I site で切断し、Ambion 社の MAXIscript *in vitro* Transcription Kits (#1318) を用いて、Bluescript II KS<sup>+</sup> の T3 promoter から転写を行った。得られた転写産物は、フェノール抽出及びエタノール沈殿（70% エタノールによる洗浄 2 回）を行うことにより、フリーの NTPs を確実に除去して精製した。定量は、260nm の吸光度を測定することにより行った。

反応液の一部をアガロース変性ゲルで電気泳動することにより、各 cDNA 長と同一の単一バンドとして泳動されることを確認した（図 2-5）。

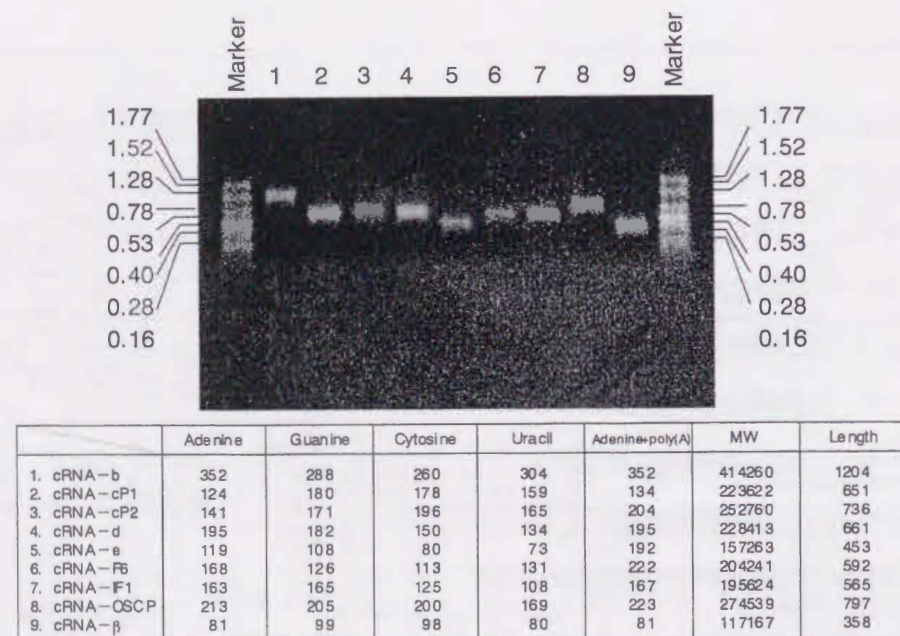


図 2-5 合成 RNA の泳動像及び分子量

各合成 RNA は、Bluescript II KS<sup>+</sup> に組み込んだ各 cDNA から *in vitro* 転写系を用いて T3 RNA polymerase により合成した。この泳動像は、反応液をホルムアルデヒド変性ゲルにより泳動し、サイバークリーンで染色したものである。表には、各合成 RNA の塩基数・分子量・長さを示してある。

## 2.2-4 Poly(A)<sup>+</sup>RNA の精製

ここでは、個体間のアーティファクトを減らす目的で、約 300 代の兄妹交配により個体間の遺伝的差異が少ないとされる近交系 Fischer 344 系ラットを実験動物として用いた。2, 8, 35, 52, 90 週齢の各 3 匹の Fischer 344 系ラットより脳・肝臓・心臓・腎臓を摘出し、その各々約 1 グラム（2 週齢ラットは組織量が少ないので、ホモジナイズの段階で 5 匹分を混合してサンプルとした）から、グアニジンチオシアネート・CsCl 超遠心法により total RNA を抽出した。得られた total RNA は、さらにタンパク質と DNA の混入を防ぐために、2 位の炭素の -OH と -H の差を利用した酸性フェノールによる抽出とエタノール沈殿を行うことにより精製した。これを Oligo(dT)Latex <super> で 2 回精製することにより、ribosomal-RNA を高度に除去して高純度な poly(A)<sup>+</sup>RNA を得た（図 2-6）。こうして得られた poly(A)<sup>+</sup>RNA は、ノーザンブロッティングの結果、目的のバンド以外への各プローブの結合は認められなかった（data not shown）ので、この方法で精製した poly(A)<sup>+</sup>RNA がドットブロッティング法による定量に十分適することが示された。

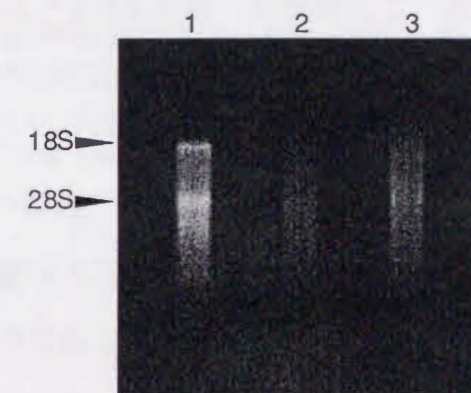


図 2-6 Poly(A)<sup>+</sup>RNA の精製度の確認

Poly(A)<sup>+</sup>RNA は、Total RNA より oligo(dT) Latex<super> を用いて 2 回精製した。精製度の確認は、吸光度測定と電気泳動により行った。ここには、8 週齢ラットの各臓器から精製した RNA の電気泳動の一例を示してある。1: Total RNA 1.5μg (kidney) 2: Poly(A)<sup>+</sup>RNA 1.5μg (kidney) 3: Poly(A)<sup>+</sup>RNA 2.0μg (brain)



## 2.2-5 ドットブロッキング法による mRNA の定量

ブロッキングは BIO-RAD 社の Bio-Dot SF Apparatus (170-65-42) を用いて行い、1 枚のメンブランにつき、内部標準試料として 8 段階 (320 pg, 160 pg, 80 pg, 40 pg, 20 pg, 10 pg, 5 pg, 2.5 pg) に希釈した各サブユニットの合成 RNA と、目的のサンプルとして各週齢 (2, 8, 35, 52, 90) の各種臓器 (脳, 肝, 心, 腎) から単離精製した poly(A)<sup>+</sup>RNA 100 ng ずつを同時にプロットした。ハイブリダイゼーションは、メンブラン 1 cm<sup>2</sup> 当たり 150 μl の溶液中で 42℃, 12 時間以上行った。洗浄は、2×SSPE/0.1%SDS 中で 45℃・15 分間を 3 回, 1×SSPE/0.1%SDS 中で 45℃・30 分間を 1 回, 0.25×SSPE/0.1%SDS 中で 45℃・15 分間を 1 回で行なった。また、プロットは各サブユニットの合成 RNA につきそれぞれ独立して準備し、ハイブリダイゼーションを一枚のメンブラン当たり 1 回ずつ行なった。各サブユニットの合成 RNA を mixture としてプロットし、リプロービングを繰り返す方法もあるが、これでは問題が生じた。プローブの除去には、例えば、沸騰させた水 (あるいは 0.1×SSC, 0.1 % SDS) の中にメンブランを入れ火を止めて室温まで冷却するといったような厳しい洗浄条件が必要となる。このような条件下では、DNA-RNA のハイブリッドの結合力が非常に強いこともあり、合成 RNA や poly(A)<sup>+</sup>RNA が解離してしまい、リプロービングの反復回数により結果に大きなバラツキが生じた。そこで、こういったトラブルを避けるために、ここではリプロービングは採用していない。

これを富士フィルムのイメージングアナライザー (BAS-1500) を用いて、各シグナル強度を測定し (図 2-7), 内部標準試料のシグナル強度を基にした直線回帰により各サブユニットの量を (pg/100ng poly(A)<sup>+</sup>RNA) の単位で算出した (図 2-8, Table 2-1)。これを各サブユニットについてそれぞれ 3~5 回行い、モル量の平均値±標準偏差として各臓器における含量と、各サブユニットの mRNA レベルの化学量論比をグラフに表した (図 2-9, 2-10)。

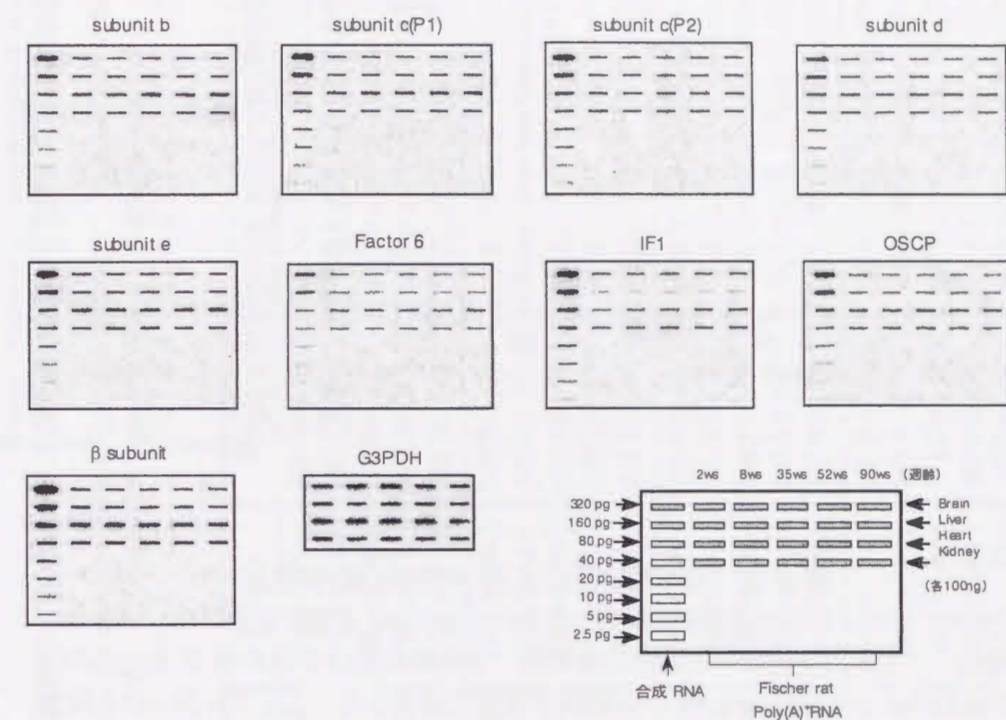
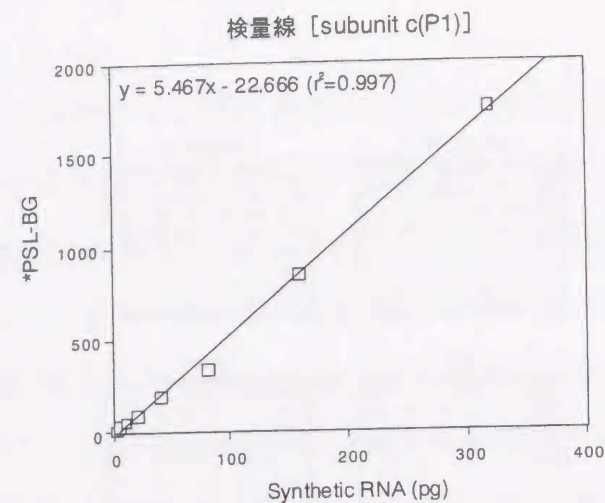


図 2-7 Fischer (F344/DuCrj) rat の各週齢・各種臓器における H<sup>+</sup>-ATP 合成酵素各サブユニット mRNA のドットプロット解析  
各週齢の Fischer (F344/DuCrj) rat の各種臓器から高純度に単離精製した poly(A)<sup>+</sup>RNA をそれぞれ 100ng ずつ右下図に示したようにプロットし、また各サブユニットに対応する合成 RNA を 8 段階に希釈して左列にプロットした。各プローブは、ランダムプライマー法により [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP でラベルした。これは、富士フィルム社のイメージングプレートに露光し、同社のバイオイメージングアナライザー (Mac BAS-1500) により解析した結果である。





Sample	PSL-BG	pg/100ng Poly(A) <sup>+</sup> RNA	amol/100ng Poly(A) <sup>+</sup> RNA
Brain	2w	85.0	19.7
	8w	56.6	14.5
	35w	53.9	14.0
	52w	77.1	18.2
	90w	66.3	16.3
Liver	2w	75.5	18.0
	8w	73.0	17.5
	35w	73.7	17.6
	52w	71.9	17.3
	90w	82.4	19.2
Heart	2w	254.7	50.7
	8w	354.1	68.9
	35w	341.2	66.6
	52w	323.1	63.2
	90w	359.1	69.8
Kidney	2w	73.9	17.7
	8w	100.1	22.5
	35w	94.8	21.5
	52w	100.0	22.4
	90w	91.7	20.9

subunit c(P1) ; MW=223622

図 2-8 直線回帰による mRNA 量の算出

各サブユニットの内部標準試料から得られる PSL-BG を基に左図の様な検量線を作製し、これから右図に示すように各臓器・各週齢における mRNA 量を pg/100ng poly(A)<sup>+</sup>RNA と amol/100ng poly(A)<sup>+</sup>RNA の単位で算出した。ここでは得られた検量線の一例として subunit c(P1) について示した。全サブユニットについても同様の検量線が得られた。\*PSL-BG：富士フィルムバイオイメージングアナライザーで用いられる放射線強度の単位で、バックグラウンドを差し引いた値。

その結果、核にコードされた H<sup>+</sup>-ATP 合成酵素の各サブユニットの mRNA 量は、F1-β subunit では他と比べてとりわけ高かったが、その他のサブユニットでは、ほぼ同一レベルであることがわかった。また、subunit c(P2) と IF1 を除く 7 種のサブユニットの各臓器における転写量は、心臓>腎臓>脳≒肝臓の順になっていた。Subunit c(P2) の転写量は、臓器特異性を示さず上記の 4 種の臓器ではほぼ等しく、IF1 の転写量は、他のサブユニットの臓器特異性とは著しく異なり、脳≒腎臓>心臓>肝臓となっていた。さらに、この傾向は今回用いたどの週齢のラットにおいても同様であった。

Table 2-1. 2～90 週齢の Fischer(F344/DuCrj) ラットの各種臓器における H<sup>+</sup>-ATP 合成酵素サブユニットの mRNA 量

各サブユニットの各週齢・各臓器における mRNA 量 (amol/100ng poly(A)<sup>+</sup>RNA) を、各々独立に行った 3～5 回の実験結果の平均値±標準偏差で示したものである。サブユニット名の後の (n) は、それぞれ独立に行った実験回数を表わす。

	b (n=3)	c(P1) (n=5)	c(P2) (n=3)	d (n=5)	e (n=3)	F6 (n=3)	IF1 (n=5)	OSCP (n=3)	β (n=4)
Brain	2w	75.5±27.2	126.7±39.5	98.3±52.6	202.0±55.5	205.9±56.5	107.3±37.5	67.6±21.8	490.9±121.0
	8w	53.2±9.6	105.4±31.7	76.0±50.1	168.2±24.5	186.7±69.3	85.7±32.4	52.5±19.5	404.5±127.8
	35w	55.9±16.8	107.0±31.1	65.2±59.1	146.9±20.6	177.3±52.2	83.3±25.0	57.9±14.7	362.2±143.5
	52w	58.9±13.1	110.4±43.8	88.1±53.2	187.3±6.3	191.6±110.4	90.5±33.3	65.4±13.8	418.6±185.0
	90w	61.9±11.5	96.2±54.8	93.5±54.7	181.5±34.8	215.9±146.3	96.3±37.1	66.8±15.5	329.8±136.0
Liver	2w	64.4±18.0	103.5±20.1	96.0±40.0	193.4±97.5	140.3±46.0	51.1±18.9	68.2±21.9	557.0±114.5
	8w	61.7±12.5	86.9±27.8	85.5±43.1	155.9±66.8	127.6±52.0	43.3±16.7	57.6±21.1	434.5±115.7
	35w	77.7±29.4	97.9±25.5	106.4±46.5	153.1±45.3	145.7±48.2	42.3±16.5	65.8±13.5	411.8±133.1
	52w	67.0±11.6	88.8±32.8	87.4±46.7	159.7±22.5	138.3±60.7	41.9±16.7	64.0±17.6	399.6±71.0
	90w	70.0±17.6	89.3±39.4	92.5±44.5	179.6±25.0	155.1±76.0	46.0±17.3	63.7±13.4	329.8±101.9
Heart	2w	128.9±57.0	149.3±21.0	229.2±26.6	514.4±248.6	381.3±96.7	80.6±35.3	206.5±66.2	1600.4±481.0
	8w	143.8±57.2	127.1±47.0	242.9±46.5	491.9±206.7	352.1±111.6	76.5±27.0	189.3±63.6	1452.2±567.8
	35w	185.2±104.0	130.0±35.1	267.1±71.6	414.3±108.4	404.3±153.6	80.1±21.7	217.4±63.5	1294.6±347.0
	52w	160.4±74.0	116.0±29.4	223.3±51.8	479.3±111.0	372.6±169.0	78.4±18.0	188.0±35.5	1236.1±279.1
	90w	206.9±111.5	113.5±32.5	268.2±59.0	584.9±28.2	467.4±163.3	99.6±25.3	197.2±48.5	1395.0±510.7
Kidney	2w	80.7±34.6	120.7±10.1	123.0±37.7	194.1±74.7	184.7±44.8	100.2±28.3	127.5±19.2	704.1±290.1
	8w	83.1±27.8	98.1±37.4	127.3±39.3	239.4±117.8	187.4±74.2	99.0±32.8	124.7±30.1	581.1±115.4
	35w	97.1±33.9	97.6±24.8	138.3±51.1	223.1±40.3	211.7±63.0	97.3±21.3	142.3±27.3	595.3±241.4
	52w	83.3±29.6	91.4±33.8	109.8±34.1	210.0±48.1	183.6±94.5	91.9±27.8	112.2±23.6	614.6±15.4
	90w	96.3±38.1	94.2±21.7	123.8±27.1	293.2±68.0	240.9±69.3	98.0±20.7	121.5±32.2	688.6±327.3



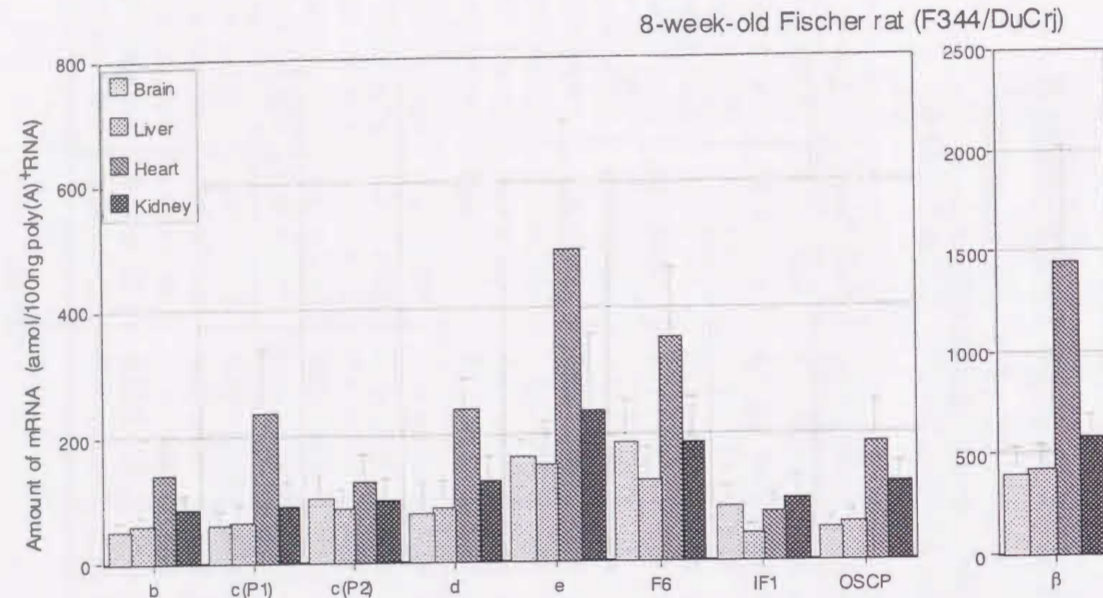


図2-9 8 week-old Fischer rat (F344/DuCrj) のH<sup>+</sup>-ATP 合成酵素の各サブユニット別に見た mRNA 量の各種臓器における分布

各サブユニットの mRNA 量は、対照とした合成 RNA 量から直線回帰により算出した重量をモル量に換算して示した。それぞれの値は、各々独立に行った3~5回の実験結果の平均値±標準偏差である。他の週齢においても同様の結果が得られた。amol (attomol; 10<sup>-18</sup> mol)

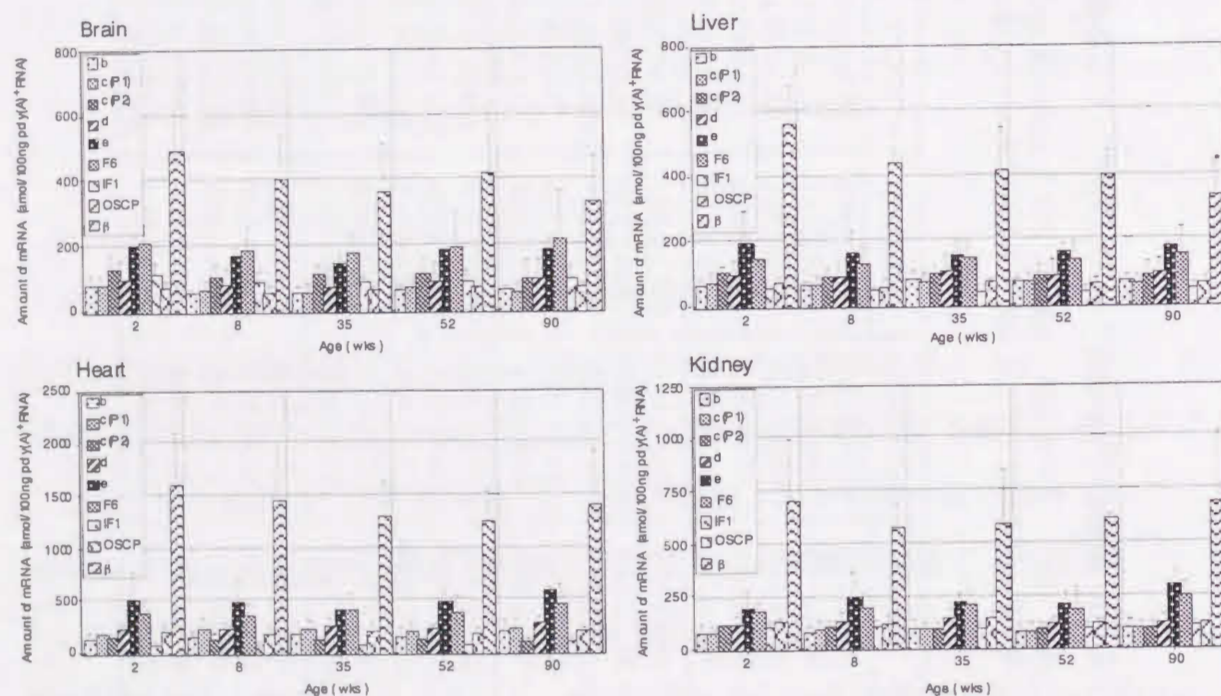


図2-10 組織別に見たH<sup>+</sup>-ATP 合成酵素各サブユニットの mRNA 量の加齢変化

各サブユニットの mRNA 量は、対照とした合成 RNA 量から直線回帰により算出した重量をモル量に換算して示した。それぞれの値は、各々独立に行った3~5回の実験結果の平均値±標準偏差である。どの組織においても、各サブユニットの転写量は加齢とは関係なく一定に保持されていた。

## 2.3 考察

ミトコンドリアの数や酸化的リン酸化能は、様々な生理的条件下に応じて変化することが、数多く報告されている<sup>1,4,2,43)</sup>。例えば、海エビ *Artemia franciscana* では、胞胚期から幼生にかけてミトコンドリアの酵素活性が著しく増加し、ミトコンドリア DNA の量も増加する<sup>1)</sup>。また、F1- $\beta$  subunit においては、胎児から新生児にかけてその転写量が上昇することが、ラットで確認されている<sup>43)</sup>。これは、出生後の外呼吸開始と共にミトコンドリアのバイオジェネシスがおこり、酸化的リン酸化が始まることで説明できる<sup>44)</sup>。逆に、ヒト線維芽細胞の老化による呼吸活性の調査によると、シトクロム c 酸化酵素活性が、80 歳では胎児の約 15% までに直線的に激減することも知られている<sup>34)</sup>。このような様々な適応変化には、核遺伝子とミトコンドリア遺伝子からの協調的な発現が必要であり、NRFs (Nuclear Respiratory Factors)<sup>8-10)</sup> や、PGC-1 (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator 1)<sup>11)</sup> 等の因子により協調的に制御されていると考えられていることは諸言でも示したとおりであるが、その詳細は明らかではない。また、核遺伝子にコードされた各サブユニットについても、染色体の異なる座位にコードされていることから、共通の転写制御システムが存在し、それぞれの相互調節を行っていることが推測される。

今回のドットプロットによる解析で、核にコードされた H<sup>+</sup>-ATP 合成酵素の各サブユニットの mRNA 量は、F1- $\beta$  subunit では他と比べてとりわけ高かったが、その他のサブユニットではほぼ同一レベルであることがわかった。また、subunit  $\alpha$ (P2) と IF1 を除く 7 種のサブユニットの各臓器における転写量は、心臓>腎臓>脳≒肝臓の順になっていた。これら 7 種のサブユニットの転写量の高低は、各臓器におけるエネルギー要求量と平行であるものと考えられる。これは、例えば、同じ個体の片方の座骨神経に電極を埋め込み、数日間電気刺激を加え続けると、他方の筋肉と比べて、シトクロム c 酸化酵素や H<sup>+</sup>-ATP 合成酵素の mRNA 量が著しく増加したという報告からも支持される<sup>11)</sup>。Subunit  $\alpha$ (P2) の転写量が、臓器特異性を示さず上記の 4 種の臓器間でほぼ等しかったことは、subunit  $\alpha$ (P2) が subunit c としての最低量を保証し、subunit  $\alpha$ (P1) が組織特異的なエネルギー要求に応答して遺伝子発現



しているためであると推測される。この事実は、 $\alpha(P1)/\alpha(P2)$  の mRNA 比が ATPase rich な組織において高いこと、寒冷条件にさらした褐色脂肪細胞では、subunit  $\alpha(P2)$  の発現には変化が見られなかったのに対して subunit  $\alpha(P1)$  では変化が見られたこと、そして hypothyroid rat を thyroid hormone ( $T_3$ ) で処理したときに、subunit  $\alpha(P1)$  の mRNA 量だけが著しく上昇したこと、といったような様々な報告からも支持されるものと思われる<sup>45)</sup>。IF1 の転写量が、他のサブユニットの臓器特異性とは著しく異なり、脳≒腎臓>心臓>肝臓となっていたことは、浪費的な ATP の分解を阻止する IF1 の生理的な必要性が臓器によって異なっており、脳や腎臓で特に多く発現する必要性を示しているものと思われ、興味深いものである。

また、図 2-9 に示されるように、ほとんどのサブユニットの発現量は心臓で異常に高く、他の組織と比べると 2 倍～3 倍も多く発現しているにも関わらず、各組織における全サブユニットの総量を 100 % として、それぞれのサブユニットの値をモル比で表わすと面白いことに、全てのサブユニットがどの組織においても、転写レベルで一定のストイキオメトリーでコンスタントに発現されていることが確認された（図 2-11, Table 2-2）。このことは、これらサブユニットの mRNA を一定の割合で発現させるための、転写レベルでの分子シンクロナイゼーション機構の存在を強く示唆していると考えられる。さらに、加齢的見地からみると、2～90 週齢ラットの各臓器での転写量に大きな変化は見られず（図 2-10），また、各臓器間での発現量についても加齢によるパターンの変化はなく、転写物の量・発現パターン共に見事に一定に保たれていた（図 2-12）。この事実は、ラット個体の生理的状態を一定に保持するという“ホメオスタシス”が、遺伝子の発現制御レベルで起こっていることを初めて示したものであり、極めて興味深いものである。

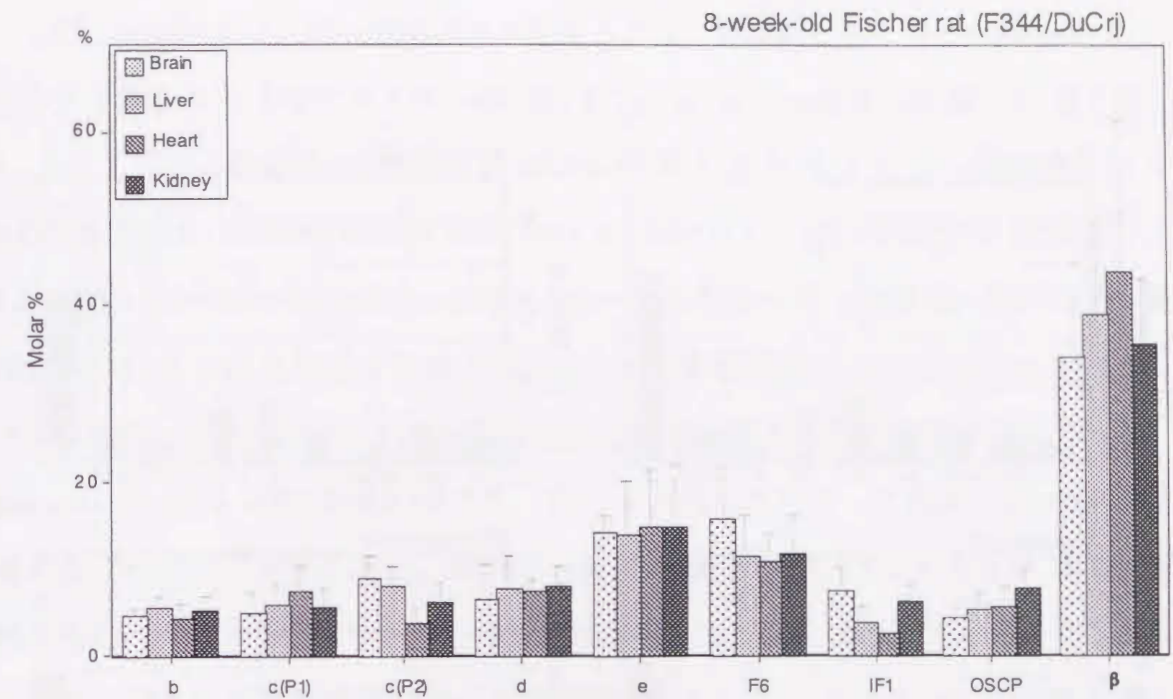


図 2-11 各サブユニットの発現量をモル比として表わした転写発現パターン

今回解析した全サブユニット（9 種）の総量を 100 % として、それぞれのサブユニットの値をモル比で表わした。どの組織においても、各サブユニットは転写レベルで一定のストイキオメトリーでコンスタントに発現されている。また、この発現パターンの加齢による変化も見られなかった。

Table 2-2. 各サブユニットの mRNA 発現量の Molar % 表示

今回解析した全サブユニット（9 種）の総量を 100 % として、それぞれのサブユニットの値をモル比で表わした。

subunit	brain	liver	heart	kidney
b	4.5±0.8	5.5±1.1	4.3±1.7	5.1±1.7
$\alpha(P1)$	4.9±2.2	5.8±2.6	7.2±3.0	5.5±2.6
$\alpha(P2)$	8.9±2.7	7.8±2.5	3.8±1.4	6.0±2.3
d	6.4±4.2	7.7±3.9	7.3±1.4	7.8±2.4
e	14.1±2.1	14.0±6.0	14.8±6.2	14.7±7.2
F6	15.7±5.8	11.4±4.7	10.6±3.4	11.5±4.6
IF1	7.2±2.7	3.9±1.5	2.3±0.8	6.1±2.0
OSCP	4.4±1.6	5.2±1.9	5.7±1.9	7.7±1.8
$\beta$	34.0±10.7	38.9±10.4	43.8±17.1	35.7±7.1



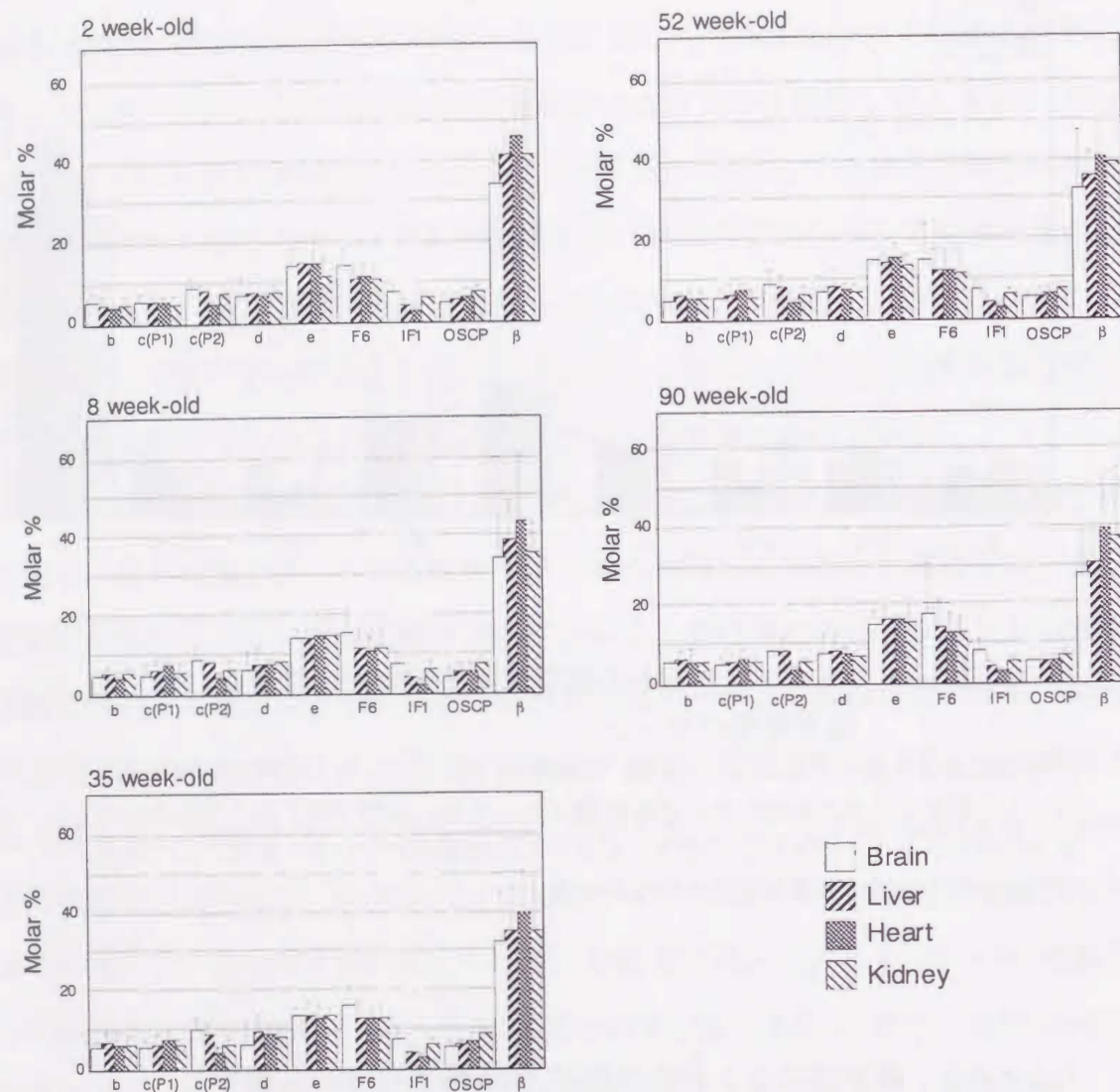


図 2-12 モル比として表わした各サブユニット転写発現パターンの加齢変化

2, 8, 35, 52, 90 週齢のラットの脳・肝臓・心臓・腎臓における各サブユニットの転写発現パターンを示す。今回解析に用いた 9 種のサブユニットの総量を 100 % として、それぞれのサブユニットの値をモル比で表わした。

次に、mRNA とタンパク質のストイキオメトリーを比較したところ (Table 2-3) , タンパク質のストイキオメトリーは、 $\beta : b : c : d : e : \text{factor 6} : \text{OSCP} = 3 : 2 : 10 : 1 : 2 : 2 : 1$  であるのに対して、mRNA のストイキオメトリーは、 $\beta : b : c(P1)+c(P2) : d : e : \text{factor 6} : \text{OSCP} = 8.0 \pm 2.3 : 1.0 \pm 0.3 : [(1.2 \pm 0.5) + (1.3 \pm 0.4)] : 1.5 \pm 0.6 : 2.9 \pm 1.1 : 2.5 \pm 0.9 : 1.2 \pm 0.4$  と一致しなかった。例えば、膜内で  $H^+$  輸送にかかわる pore を形成するサブユニット c と触媒部位の  $\beta$  サブユニットのタンパク質のストイキオメトリーは 10 : 3 であるが、mRNA のストイキオメトリーは、subunit c の c(P1), c(P2) を合わせても、2.5 : 8 となっていた。これは、 $H^+$ -ATP 合成酵素をアッセンブルする際に、膜内で pore を形成するサブユニット c が過剰に発現すると、プロトンリークが起こり細胞に傷害が生じてしまうことから、その発現を抑え、ATP 合成酵素構築における律速段階となつて、キーロール的な働きをしているとも考えられる。

また、仮にその蛋白質の合成速度をアミノ酸一残基を付加する速度が全て等しいと仮定して、mRNA 発現量と premature な残基数から算出し、比較してみた (Table 2-3) が、これでもやはり大きく異なっていた。これは、これらのサブユニットのうちのいくつかは  $H^+$ -ATP 合成酵素としてだけではなく、違った働きを持っているためであると考えられる。例えば、このうち合成速度が非常に高く算出されるサブユニット e は、酵母でミトコンドリア内膜に存在する輸送タンパクの Tim11 と同一のものであるという報告<sup>46)</sup> がある。また、転写後・翻訳段階での調節も否定できない。

さらに、今回実験に用いた  $H^+$ -ATP 合成酵素のサブユニットについて、その全遺伝子配列から、協調的発現に関与すると考えられている先に示したような因子のシスエレメントについての解析を genetyx で行った結果を Table 2-4 に示した。しかし、全てに共通したものはみられず、これらだけで簡単に説明できるものではないことがわかる。



Table 2-3. H<sup>+</sup>-ATP synthase の mRNA およびタンパクレベルでのストイキオメトリ-とサブユニットタンパクの合成速度  
 タンパク質の合成速度はアミノ酸一残基を付加する速度が全て等しいと仮定して, mRNA 発現量と premature な残基数から算出した。  
 ( ) は, b=1.0 とした場合の値である。

Subunit of H <sup>+</sup> -ATP synthase	Stoichiometry of mRNA	Length of premature polypeptide (residues)	Relative rate of protein synthesis	Stoichiometry of subunits in H <sup>+</sup> -ATP synthase
b	1.0±0.3	256 <sup>*1</sup>	2.1 (1.0)	2
c	-	-	9.6 (4.6)	10
c(P1)	1.2±0.5	136 <sup>*2</sup>	-	-
c(P2)	1.3±0.4	141 <sup>*3</sup>	-	-
d	1.5±0.6	161 <sup>*4</sup>	5.0 (2.4)	1
e	2.9±1.1	71 <sup>*5</sup>	21.9 (10.4)	2
F6	2.5±0.9	108 <sup>*6</sup>	12.4 (5.9)	2
IF1	1.0±0.4	107 <sup>*7</sup>	5.0 (2.4)	1
OSCP	1.2±0.4	213 <sup>*8</sup>	3.0 (1.4)	1
β	8.0±2.3	535 <sup>*9,*10</sup>	8.0 (3.8)	3

<sup>\*1</sup>;Tsurumi et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **169**, 136 (1990), <sup>\*2</sup>;Higuti et al. *Biochim. Biophys. Acta* **1172** (3), 311(1993), <sup>\*3</sup>;Higuti et al. *Biochim. Biophys. Acta* **1172** (3), 311 (1993), <sup>\*4</sup>;Higuti et al. *J. Biochem.* **114** (5), 714 (1993), <sup>\*5</sup>;Higuti et al. *Biochemistry* **31** (49), 1245 (1992), <sup>\*6</sup>;Higuti et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **171**, 1079 (1991), <sup>\*7</sup>;Lebowitz et al. *Arch. Biochem. Biophys.* **301**, 64(1993), <sup>\*8</sup>;Higuti et al. *Biochim. Biophys. Acta* **1172** (3), 311 (1993), <sup>\*9</sup>;Garboczi et al. *Biochemistry* **27** (2), 553 (1988), <sup>\*10</sup>;Boulet et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **159** 1184 (1989)

Table 2-4. 哺乳動物 H<sup>+</sup>-ATP 合成酵素のサブユニット遺伝子上にみられる NRF-1, NRF-2, YY1, USF2, OXBOX, REBOX, PGC-1 の cis-elements .

各 cis-elements と 80% 以上のホモロジーを示す配列をカウントした. PGC-1 については cis-elements が知られていないので, 発現が PGC-1 により制御されるかどうかを示した.

Genes of H <sup>+</sup> -ATP synthase subunit (bps)	cis-element (>80%)					
	NRF-1 (YGGCAYGGCR) <sup>*7</sup>	NRF-2 (CHTCGGT) <sup>*8</sup>	YY1 (CCATNT) <sup>*9</sup>	USF2 (CAGGTG) <sup>*10</sup>	OXBOX (GGCTCTAAGAGG) <sup>*11</sup>	PGC-1 (CGGTATA) <sup>*11</sup>
α (18,004) <sup>*1</sup>	0	4	10	13	0	0
β (10,186) <sup>*2</sup>	0	2	5	6	3	1
γ (10,113) <sup>*3</sup>	1	2	8	7	0	2
b (2,101) <sup>*4</sup>	0	0	5	3	0	1
c(P1) (9,457) <sup>*5</sup>	0	0	4	5	1	1
c(P2) (15,016) <sup>*6</sup>	5	3	12	9	0	0
e (4,508) <sup>*6</sup>	0	4	7	3	0	0
	(*R:AG, Y:CT,H:ACT, N:ACGT)					

<sup>\*1</sup>;Akiyama et al. *Biochim. Biophys. Acta* **1219**, 129 (1994), <sup>\*2</sup>;Neckelmann et al. *Genomics* **5**, 829 (1989), <sup>\*3</sup>;Dyer et al. *Biochemistry* **28**, 3670 (1989), <sup>\*4</sup>; unpublished data by Morimoto, K. and Higuti et al., <sup>\*5</sup>;Mark et al. *Biochem.J.* **293**, 51 (1993), <sup>\*6</sup>; unpublished data by Koto, Y. and Higuti et al., <sup>\*7</sup>;Evans et al. *Genes Dev.* **4**, 1023 (1990), <sup>\*8</sup>;Virbasius et al. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* **91**, 1309 (1994), <sup>\*9</sup>;Yang et al. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* **93**, 12845 (1996), <sup>\*10</sup>;Breen et al. *Biochim. Biophys. Acta* **1428**, 169 (1999), <sup>\*11</sup>;Kagawa et al. *Bioscience Reports* **17**, 115 (1997), <sup>\*12</sup>;Wu et al. *Cell* **98**, 115 (1999)



以上のように、 $H^+$ -ATP 合成酵素の発現を転写レベルでシンクロナイズさせる機構が存在していることを今回初めて示すことができたが、そのメカニズムの解明までには至らなかった。今後、今回示した結果を基に、さらなる転写調節因子の探索や mRNA の stability を含む転写後調節、そして翻訳段階での調節等を踏まえての解析を行うことにより、 $H^+$ -ATP 合成酵素の分子シンクロナイズ機構が明らかとなることが期待される。そして、ホメオスターシスを維持する基本転写レベルの測定が、エネルギー代謝疾患等のさまざまな疾患の診断に応用されることが期待される。

なお、この章の研究は以下の論文をまとめたものである。

- Himeda, T., Morokami, K., Arakaki, N., Shibata, H. and Higuti, T. (2000)

Synchronized Transcriptional Gene Expression of  $H^+$ -ATP synthase Subunits in Different Tissues of Fischer 344 Rats of Different Ages.

*Eur. J. Biochem.* **267**, 6938-6942

- Sangawa, H., Himeda, T., Shibata, H. and Higuti, T. (1997)

Gene expression of subunit  $\alpha$ (P1), subunit  $\alpha$ (P2), and oligomycin sensitivity-conferring protein may play a key role in biogenesis of  $H^+$ -ATP synthase in various rat tissues.

*J. Biol. Chem.* **272**, 6034-6037

## 2.4 実験方法

### 2.4-1 実験動物

使用動物としては、個体差等のアーティファクトを減少させる目的で、約 300 代の兄妹交配により個体間の遺伝的差異が少ないとされる近交系 Fischer 344 ラット (F344/DuCrj) を用いた。今回使用した 2, 8, 35, 52 週齢の Fischer 344 系ラット (オス) は、日本チャールズリバー社より購入した。90 週齢のラットは 70 週齢の時点で日本チャールズリバー社より購入し、引き続き本学医学部附属動物実験施設の SPF (Specific Pathogen Free) ラット飼育室にて飼育した。餌は日本チャールズリバー社と同じものを与えた。

### 2.4-2 *In Vitro* 転写系による RNA の合成

CsCl 超遠心で精製した目的 DNA を含むプラスミドを制限酵素 *Not*I で直鎖状にし、電気泳動により完全に直鎖状になったことを確認した (ここで環状のプラスミドが残っていると、転写反応に支障が出る)。これを、Proteinase K (100 ~ 200  $\mu$ g/ml) で 45 $^{\circ}$ C, 30min 処理し、フェノール抽出、エタノール沈殿を行なって精製した。こうして得られた DNA を鋳型として、MAXIscript In Vitro Transcription Kits (Ambion#1318) により RNA 合成反応を行なった。合成した RNA は、アガロース/ホルムアルデヒドゲル電気泳動により確認した。

### 2.4-3 組織からの mRNA の精製

ラットを断頭脱血し、各臓器を摘出して液体窒素で凍結後、木づちで素早く粉碎して、各臓器 1g ずつを 1% となるように 2-メルカプトエタノールを加えたグアニジンチオシアネートバッファー中に懸濁しホモジネートした。これを、5.7M CsCl 溶液に重層し、超遠心機 BECKMAN L8M-SW-28 で 20 $^{\circ}$ C, 26,000rpm, 20~24 時間遠心して total RNA のペレットティングを行った。さらに、酸性フェノールによる抽出とエタノール沈殿で精製した後、Oligo (dT) Latex <super> (日本合成ゴム、日本ロッシュ) で 2 回精製して、高度に rRNA の除去された高純度の mRNA を得た。



#### 2.4-4 ドットブロッキング

BIO-RAD 社の Bio-Dot SF Apparatus (170-65-42)を用いて行った。メンブランは、ポジティブチャージナイロンメンブランである Hybond-N+ を用いた。

変性させた（変性バッファー；脱イオンホルムアミド=3.75ml, 37%ホルムアルデヒド=1.215ml, 10×MOPS buffer=0.75ml）合成 RNA（320 pg, 160 pg, 80 pg, 40 pg, 20 pg, 10 pg, 5 pg, 2.5 pg）と poly(A)<sup>+</sup>RNA（100 ng）をそれぞれ一定量ずつ各ウェルにアプライし、ウェルが乾燥しないように注意しながら均等に吸引させた。続いて、0.05N NaOH に浸した Whatman 3MM paper 上に RNA 結合面を上にして5 分間置き、2×SSPE でリンスして余分な水分を Whatman paper 上で除いた。その後、80℃で1 時間ベーキングし、UV クロスリンカーにて紫外線照射を行って固定させた。

#### 2.4-5 ハイブリダイゼーション

メンブランをポリシーラーバッグに入れ、150μl/cm<sup>2</sup> となるようにハイブリダイゼーション液（5×SSPE, 50 % 脱イオン化ホルムアミド, 5×Denhardt 溶液, 0.5% SDS, 200μg/ml ssDNA（ssDNAは熱変性してから用いる））を入れて充分泡を抜いてからシールし、42℃で5 時間以上インキュベートしてプレハイブリダイゼーションした。その後、メンブランを新しいポリシーラーバッグに入れ、150μl/cm<sup>2</sup> となるようにハイブリダイゼーション液を入れ、ランダムプライマー法で標識したプローブ DNA を 5×10<sup>5</sup> cpm/ml となるように加えて泡を抜きシールし、42℃で12 時間以上インキュベートしてハイブリダイゼーションした。プローブは、図 2-4 に示した酵素でプラスミドから切出したものを、ランダムプライマー法でラベルして用いた。ハイブリ後の洗浄は、2×SSPE/0.1%SDS 中 45℃で15 分間（3 回）、1×SSPE/0.1%SDS 中 45℃で30 分間（1 回）、0.25×SSPE/0.1%SDS 中 45℃で15 分間（1 回）で行なった。こうして得られたメンブランをラップフィルムで包み、イメージングプレートにはさんで室温で6 時間露光した後、Mac-BAS 1500 により解析した。

#### 2.5 参考文献

- 1) Vallejo, C. G., Lopez, M., Ochoa, P., Manzanares, M. and Garesse, R. (1995) Mitochondrial differentiation during the early development of the brine shrimp *Artemia franciscana*. *Biochem. J.* **314**, 505-510
- 2) Higuti, T., Negama, T., Takigawa, M., Uchida, J., Yamane, T., Asai, T., Tani, I., Oeda, K., Shimizu, M., Nakamura, K. and Ohkawa, H. (1988) A hydrophobic protein, chargerin II, purified from rat liver mitochondria is encoded in the unidentified reading frame A6L of mitochondrial DNA. *J. Biol. Chem.* **263**, 6772-6776
- 3) Oda, T., Futaki, S., Kitagawa, K., Yoshihara, Y., Tani, I. and Higuti, T. (1989) Orientation of chargerin II (A6L) in the ATP synthase of rat liver mitochondria determined with antibodies against peptides of the protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **165**, 449-459
- 4) Muraguti, M., Yoshihara, Y., Tsunemitsu, T., Tani, I. and Higuti, T. (1990) Stoichiometry of chargerin II (A6L) in the H<sup>+</sup>-ATP synthase of rat liver mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **168**, 226-231
- 5) Higuti, T., Takigawa, M., Kotera, Y., Oka, H., Uchida, J., Arakaki, R., Fujita, T. and Ogawa, T. (1985) Purified hydrophobic proteins, chargerins, are essential for energy transduction in oxidative phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 1331-1335
- 6) Uchida, J., Takigawa, M., Yamane, T., Negama, T., Tani, I. and Higuti, T. (1987) Immunochemical study of role of chargerin II, a product of URFA6L of mitochondrial DNA in energy transduction of rat liver mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **146**, 953-958
- 7) 樋口富彦 (1993) エネルギー変換システム“生体超分子システム”生命理解の  
かなめ 猪飼篤・樋口富彦・吉村哲郎・田中啓二編集  
蛋白質・核酸・酵素増刊号 **38**, 1117-1132.



- 8) Scarpulla, R.C. (1997) Nuclear control of respiratory chain expression in mammalian cells. *J. Bioenerg. Biomembr.* **29**, 109-119
- 9) Evans, M.J. and Scarpulla, R.C. (1990) NRF-1: a trans-activator of nuclear-encoded respiratory genes in animal cells. *Genes Dev.* **4**, 1023-1034
- 10) Virbasius, J.V., Virbasius, C.A. and Scarpulla, R.C. (1993) Identity of GABP with NRF-2, a multisubunit activator of cytochrome oxidase expression, reveals a cellular role for an ETS domain activator of viral promoters. *Genes Dev.* **7**, 380-392
- 11) Wu, Z., Puigserver, P., Andersson, U., Zhang, C., Adelmant, G., Mootha, V., Troy, A., Cinti, S., Lowell, B., Scarpulla, R. C. and Spiegelman, B. M. (1999) Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* **98**, 115-124
- 12) Kagawa, Y., Hamamoto, T., Endo, H., Ichida, M., Shibui, H. and Hayakawa, H. (1997) Genes of human ATP synthase: their roles in physiology and aging. *Biosci. Rep.* **17**, 115-146
- 13) Abraham, J. P., Leslie, A. G., Lutter, R. and Walker, J. E. (1994) Structure at 2.8 Å resolution of F<sub>1</sub>-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* **370**, 621-628
- 14) Yoshihara, Y., Nagase, H., Yamane, T., Oka, H., Tani, T. and Higuti, T. (1991) H<sup>+</sup>-ATP synthase from rat liver mitochondria. A simple, rapid purification method of the functional complex and its characterization. *Biochemistry* **30**, 6854-6860
- 15) Higuti, T., Yoshihara, Y., Kuroiwa, K., Kawamura, Y., Toda, H. and Sakiyama, F. (1992) A simple, rapid method for purification of epsilon-subunit, coupling factor 6, subunit d, and subunit e from rat liver H<sup>+</sup>-ATP synthase and determination of the complete amino acid sequence of epsilon-subunit. *J. Biol. Chem.* **31**, 22658-22661
- 16) Higuti, T., Kuroiwa, K., Kawamura, Y. and Yoshihara, Y. (1992) Complete amino acid sequence of subunit e of rat liver mitochondrial H<sup>+</sup>-ATP synthase. *Biochemistry* **31**, 12451-12454
- 17) Tsurumi, C., Yoshihara, Y., Osaka, F., Yamada, F., Tani, I., Higuti, T., Shimizu, M., Oeda, K., Ohkawa, H., Toda, H., Kakuno, T., Sakiyama, F., Kumatori, A., Tanaka, K. and Ichihara, A. (1990) cDNA cloning and sequencing for the import precursor of subunit B in H<sup>+</sup>-ATP synthase from rat mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **169**, 136-142
- 18) Higuti, T., Tsurumi, C., Osaka, F., Kawamura, Y., Tsujita, H., Yoshihara, Y., Tani, I. and Ichihara, A. (1991) Molecular cloning of cDNA for the import precursor of human subunit B of H<sup>+</sup>-ATP synthase in mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **178**, 1014-1020
- 19) Higuti, T., Osaka, F., Yoshihara, Y., Tsurumi, C., Kawamura, Y., Tani, I., Toda, H., Kakuno, T., Sakiyama, F., Tanaka, K. and Ichihara, A. (1990) cDNA cloning and sequencing for the import precursor of coupling factor 6 in H<sup>+</sup>-ATP synthase from rat liver mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **171**, 1079-1086
- 20) Higuti, T., Tsurumi, C., Kawamura, Y., Tsujita, H., Osaka, F., Yoshihara, Y., Tani, I., Tanaka, K. and Ichihara, A. (1991) Molecular cloning of cDNA for the import precursor of human coupling factor 6 of H<sup>+</sup>-ATP synthase in mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **178**, 793-799
- 21) Higuti, T., Kuroiwa, K., Kawamura, Y., Morimoto, K. and Tsujita, H. (1993) Molecular cloning and sequence of cDNAs for the import precursors of oligomycin sensitivity conferring protein, ATPase inhibitor protein, and subunit c of H<sup>+</sup>ATP synthase in rat mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* **1172**, 311-314
- 22) Higuti, T., Kawamura, Y., Kuroiwa, K., Miyazaki, S. and Tsujita, H. (1993) Molecular cloning and sequence of two cDNAs for human subunit c of H<sup>+</sup>-ATP synthase in mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* **1173**, 87-90
- 23) Higuti, T., Kuroiwa, K., Miyazaki, S., Yoshihara, Y., Toda, H., Kakuno, T. and Sakiyama, F. (1993) The complete amino acid sequence of subunit d of rat liver mitochondrial H<sup>+</sup>-ATP synthase. *J. Biochem.* **114**, 714-717



- 24) Collinson, I.R., Runswick, M.J., Buchanan, S.K., Fearnley, I.M., Skehel, J.M., van Raaij, M.J., Griffiths, D.E. and Walker, J.E. (1994) Fo membrane domain of ATP synthase from bovine heart mitochondria: purification, subunit composition, and reconstitution with F<sub>1</sub>-ATPase. *Biochemistry* **33**, 7971-7978
- 25) Belogradov, G. I., Tomich, J. M. and Hatefi, Y. (1996) Membrane topography and near-neighbor relationships of the mitochondrial ATP synthase subunits e, f, and g. *J. Biol. Chem.* **271**, 20340-20345
- 26) Spannagel, C., Vaillier, J., Arselin, G., Graves, P. V. and Velours, J. (1997) The subunit f of mitochondrial yeast ATP synthase--characterization of the protein and disruption of the structural gene ATP17. *Eur. J. Biochem.* **247**, 1111-1117
- 27) Futai, M. and Kanazawa, H. (1983) Structure and function of proton-translocating adenosine triphosphatase (F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>): biochemical and molecular biological approaches. *Microbiol. Rev.* **47**, 285-312
- 28) Walker, J.E., Fearnley, I.M., Gay, N.J., Gibson, B.W., Northrop, F.D., Powell, S.J., Runswick, M. J., Saraste, M. and Tybulewicz, V. L. (1985) Primary structure and subunit stoichiometry of F<sub>1</sub>-ATPase from bovine mitochondria. *J. Mol. Biol.* **184**, 677-701
- 29) Arakaki, N., Ueyama, Y., Hirose, M., Himeda, T., Futaki, S., Kitagawa, K. and Higuti, T. (2001) Stoichiometry of subunit e in rat liver mitochondrial H<sup>+</sup>-ATP synthase and membrane topology of its putative Ca<sup>2+</sup>-dependent regulatory region. *Biochim. Biophys. Acta* (in press)
- 30) Hekman, C., Tomich, J. M. and Hatefi, Y. (1991) Mitochondrial ATP synthase complex. Membrane topography and stoichiometry of the F<sub>0</sub> subunits. *J. Biol. Chem.* **266**, 13564-13571
- 31) 香川靖雄, 太田成男 (1989) 生化学 **61**, 75
- 32) Szekely, E. and Montgomery, D. L. (1984) Glucose represses transcription of *Saccharomyces cerevisiae* nuclear genes that encode mitochondrial components. *Mol. Cell. Biol.* **4**, 939-946
- 33) Cantatore, P., Polosa, L. P., Fracasso, F., Flaggella, Z. and Gadaleta, M. N. (1986) Quantitation of mitochondrial RNA species during rat liver development: the concentration of cytochrome oxidase subunit I (CoI) mRNA increases at birth. *Cell. Differ.* **19**, 125-132
- 34) Williams, R. S., Garcia-Moll, M., Mellor, J., Salmons, S., Harlan, W. and Williams, H. (1987) Adaptation of skeletal muscle to increased contractile activity. Expression nuclear genes encoding mitochondrial proteins. *J. Biol. Chem.* **262**, 2764-2767
- 35) Nelson, B. D., Mutvei, A. and Joste, V. (1984) Regulation of biosynthesis of the rat liver inner mitochondrial membrane by thyroid hormone. *Arch. Biochem. Biophys.* **228**, 41-48
- 36) 香川靖雄 (1996) 「老化のバイオサイエンス」 羊土社
- 37) 松尾光芳編著 (1997) 「老化と遺伝子情報の発現」 学会出版センター
- 38) Boulet, D., Poirier, J. and Cote, C. (1989) Studies on the biogenesis of the mammalian ATP synthase complex: isolation and characterization of a full-length cDNA encoding the rat F<sub>1</sub>-beta-subunit. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **159**, 1184-1190
- 39) Brtler, E. T. and Chamberlin, M. J. (1982) Bacteriophage SP6-specific RNA polymerase. I. Isolation and characterization of the enzyme. *J. Biol. Chem.* **257**, 5772-5778
- 40) Morris, C. E., Klement, J. F. and McAllister, W. T. (1986) Cloning and expression of the bacteriophage T3 RNA polymerase gene. *Gene* **41**, 193-200
- 41) Davanloo, P., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J. and Studier, F. W. (1984) Cloning and expression of the gene for bacteriophage T7 RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 2035-2039
- 42) Levy, F. H. and Kelly, D. P. (1997) Regulation of ATP synthase subunit e gene expression by hypoxia: cell differentiation stage-specific control. *Am. J. Physiol.* **272**, C457-465



- 43) Izquierdo, J. M., Ricart, J., Ostronoff, L. K., Egea, G. and Cuezva, J. M. (1995) Changing patterns of transcriptional and post-transcriptional control of beta-F1-ATPase gene expression during mitochondrial biogenesis in liver. *J. Biol. Chem.* **270**, 10342-10350
- 44) Papa, S. (1996) Mitochondrial oxidative phosphorylation changes in the life span. Molecular aspects and physiopathological implications. *Biochim. Biophys. Acta* **1276**, 87-105
- 45) Andersson, U., Houstek, J., and Cannon, B. (1997) ATP synthase subunit c expression: physiological regulation of the P1 and P2 genes. *Biochem. J.* **323**, 379-385
- 46) Tokatlidis, K., Junne, T., Moes, S., Schatz, G., Glick, B.S. and Kronidou, N. (1996) Translocation arrest of an intramitochondrial sorting signal next to Tim11 at the inner-membrane import site. *Nature* **384**, 585-588

### 第3章 ミトコンドリアが異常増殖した JVS マウス心筋からの ミトコンドリアの分裂・融合と娘細胞への分配に関わる 新規因子の探索

#### 3.1 諸言

ミトコンドリアは、“分裂”や“融合”といったイベントの巧妙なバランスの維持によって、細胞分裂に伴ったミトコンドリアの分裂増殖と2個の娘細胞へのその分配を行なっていると考えられているが、その詳しい機構とそこに関わる因子は未だ不明のままである<sup>1)</sup>。

大腸菌や葉緑体では、FtsZ と呼ばれる因子がその分裂増殖の essential factor の1つであることが知られている<sup>2)</sup>。FtsZ はチューブリン様のもので、GTPase 活性を有し *in vitro* で重合することができ、細胞の分裂部位で重合してリング構造を作り細胞を分裂させることが明らかになっている<sup>2)</sup>。この FtsZ は、全ゲノムが明かとなっている *C. elegans* や *S. cerevisiae* のゲノム上では発見できない。しかし最近、藻類の *Mallomonas splendens* のミトコンドリアの分裂に関与している因子が FtsZ ホモログであることが示された<sup>3)</sup>。そして、FtsZ の発見できなかった *S. cerevisiae* では Dnm1p<sup>4)</sup>、*C. elegans* や Human では Drp1<sup>5,6)</sup> とよばれる dynamin-related protein が、ミトコンドリアの分裂に関わる因子として示され、それぞれの欠損株を用いた実験で、分裂していない少数の大きいミトコンドリアが観察されている。

また、ミトコンドリアの融合も、ミトコンドリアのダイナミクスを考える上でキーとなる重要な現象である。ミトコンドリアは、その形態を変えたり細胞分裂したりする際に、網状のミトコンドリアネットワークにおいて、個々のミトコンドリアあるいは別々のミトコンドリアの管状構造体が、より大きくより高度に枝分かれした構造体に融合する。最近、このミトコンドリアの融合に関与する因子の一つが、ショウジョウバエの精子形成の欠損変異体で同定された<sup>7)</sup>。ショウジョウバエの精子形成過程で、ミトコンドリアは凝集し二つの巨大な構造体に融合し、形成中の精子細胞 (spermatid) の中片部 (midpiece) に取り込まれ、後に鞭毛運動を行うための ATP を産生する。ところが、この変異体では、ミトコンドリアは凝集するが融合



が起こらない。また、酵母菌でも同様の因子 Fzo1p<sup>8,9)</sup>があり、この変異体では、ミトコンドリア管状体の断片化が起こり、ミトコンドリアの融合が起こらなかった。このことから、この因子は、フューソジェン (fusogen: 融合因子) と考えられる。Fzo1p には 保存された GTP 結合部位があり、ミトコンドリアの外膜に結合しておりその大部分を細胞質側に露出されていることから、フューソジェンの機能を持つと考えられている。しかし、どのような機構でミトコンドリアの融合が行われるのかは全く解っていない。とりわけ、外膜と内膜の二重膜からできていることを考えると特別な融合装置があるものと推測される。

このように、ミトコンドリアの“分裂”や“融合”そして娘細胞への“分配”といった、その増殖機構に関する研究は現在活発に行われているが、哺乳動物のミトコンドリアについては、Drp1 とよばれる dynamin - related protein が、分裂に関わる因子として報告されているのみで、分裂増殖機構を説明するだけの十分な材料は集まっておらず、そのほとんどが不明のままである。

そこで、筆者らは、この哺乳動物ミトコンドリアの分裂増殖機構を明かすための材料として、心筋細胞でミトコンドリアの異常な増殖が確認される JVS マウス (Juvenile Visceral Steatosis mouse)<sup>10)</sup>に着目した。ここで、JVS マウスについて説明したい。

JVS マウスは、1988年に金沢大学の小泉らによって常染色体劣性の遺伝形式により、脂肪肝・心肥大・低血糖症・高アンモニア血症など様々な臨床所見を呈する C3H-H2<sup>o</sup>系のマウスとして最初に報告され、後に JVS マウスと呼ばれるようになったマウスである<sup>10)</sup>。JVS マウスは、腎臓でのカルニチン再吸収障害<sup>11)</sup>が原因とされる全身性カルニチン欠乏マウスで、生後3~4ヶ月で心肥大が合併し、全身性浮腫等により突然死することがあるため<sup>12)</sup>、寿命は非常に短いとされている。現在、心臓に関して様々な病態解析が進んでおり<sup>12-16)</sup>、組織学的分析<sup>14-16)</sup>によると、2週齢の心筋細胞においてミトコンドリアが増殖していることが確認され、8週齢ではミトコンドリアが細胞質の大部分を占めるほど増殖しており (図3-1)、この現象は加齢に伴って進行すると考えられている。このようなミトコンドリアの増殖は、心筋細胞の他、骨格筋I型繊維にも見られるが、脳、肝臓、腎臓などの臓器には見

られない<sup>17)</sup>。また、骨格筋では心臓と異なり委縮がみられ、ミトコンドリアは巨大化して増殖し、加齢に伴った進行はみられない<sup>15)</sup>。

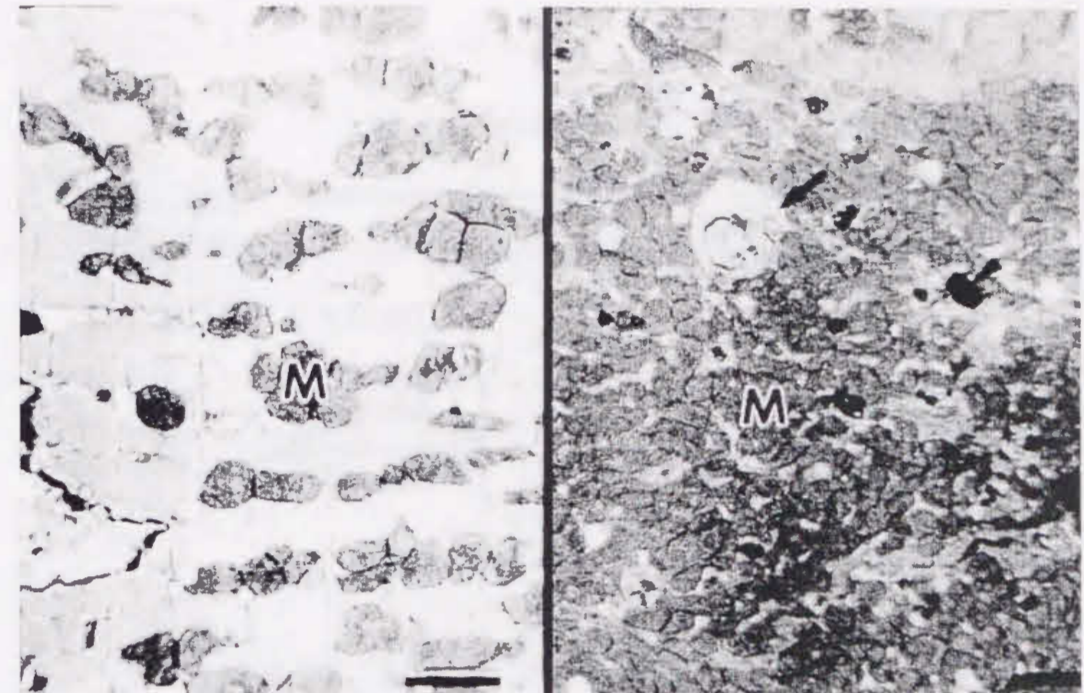


図3-1 正常マウス (左) と JVS マウス (右) の心筋ミトコンドリア  
JVS マウスでは、ミトコンドリアが細胞質の大部分を占めていることがわかる。  
M: ミトコンドリア, 矢印: 脂肪滴, 矢頭: 電子密度の高いリソゾーム様の顆粒

このような JVS マウスの心筋細胞におけるミトコンドリアの劇的な増殖は、筆者らの目的とする『ミトコンドリアのバイオジェネシスの解明』のための最適な実験材料になりうると考えられたことから、本研究を開始した。

ミトコンドリアは酸化的リン酸化系によりエネルギーを産生しており、そのエネルギー源は各種臓器により主とするものは異なる。JVS マウスでは全組織でカルニチンが欠乏しているため、血中の脂肪酸の大部分を占める長鎖脂肪酸はマトリックス内に移行されず、脂肪酸代謝障害を起こしていると考えられている<sup>18-21)</sup> (図3-2)。また、肝臓から糖の放出が亢進していることから、心臓、筋肉などの脂肪酸を主なエネルギー源としている臓器で、糖の取り込みが亢進しているのではないかと考えられている<sup>21)</sup>。さらに最近、当研究室の末永らにより、JVS マウスのミトコンドリアは、呼吸鎖複合体 (cytochrome 含量) の減少に起因した酸化的リン酸化能 (呼



吸活性・ATP-Pi 交換活性) の低下を引き起こしていることが明らかとされた<sup>23)</sup>。  
JVS マウスでは、このような原因によるエネルギー不足を補うためにミトコンドリアが増殖しているとも考えられる。

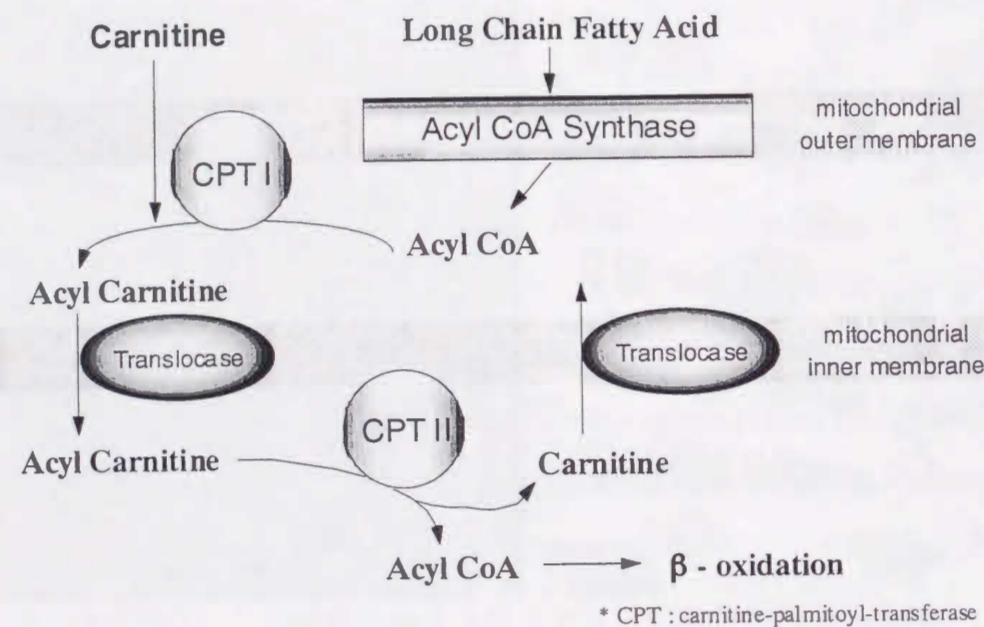


図 3-2 脂肪酸代謝系におけるカルニチンの役割

これらのことから、JVS マウスの心筋細胞では、ミトコンドリア数の増加を引き起こす制御因子が、正常マウスのそれに比べ特異的に極端に多く発現していることが予測された。そこで、まず、 $H^+$ -ATP 合成酵素サブユニット (subunit c(P1), c(P2), e,  $\beta$ , IF1) について、2 章と同様に mRNA 絶対量を定量し、転写レベルでどのように変化するかを調べた。そしてさらに、蛍光 Differential Display 法を用いて、ミトコンドリアの分裂増殖に関わる新規因子を探索した。

### 3.2 実験結果

### 3.2-1 H<sup>+</sup>-ATP 合成酵素の各サブユニット遺伝子の転写発現量の定量

今回は, subunit c(P1), c(P2), e, そしてIF1 (ATPase inhibitor protein) について, 第2章に示した方法で, JVS マウスにおけるその転写物量の解析を行なった. そのドットプロット像を, 図3-3に示した. これより, 合成RNAの希釈列から検量線を作成し, 各サブユニットの転写量を (pg/100ng poly(A)<sup>+</sup>RNA) の単位で算出し, 更にモル量に換算して, 各臓器における含量と各サブユニットの mRNA レベルの化学量論比をグラフに表した (図3-4).

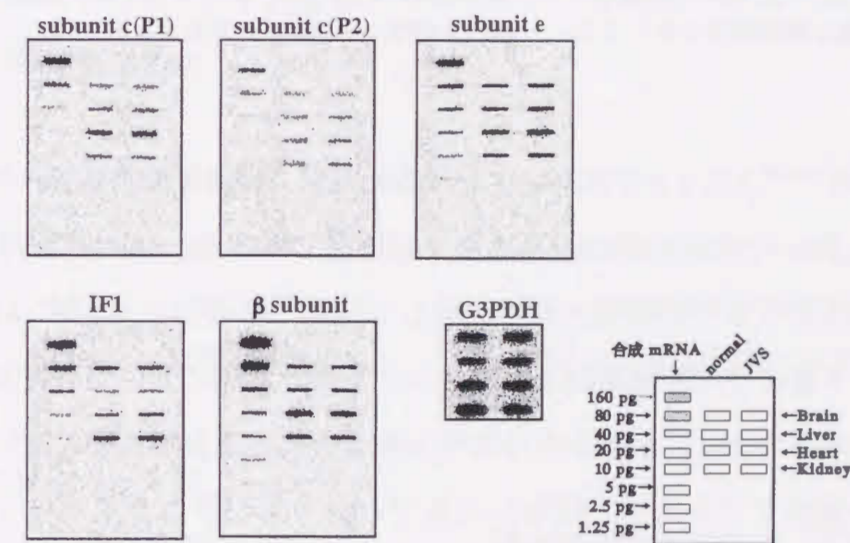


図 3-3 正常マウス・JVS マウスの各種臓器における  $H^+$ -ATP 合成酵素各サブユニット mRNA のドットプロット解析

正常マウス・JVS マウスの各種臓器から高度に精製した poly(A)<sup>+</sup>RNA を 50ng ずつ右列に，合成 RNA を 8 段階に希釈して左列にプロットした．各プローブは，ランダムプライマー法により [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP でラベルした．これは，富士フィルム社のイメージングプレートに露光し，同社のバイオイメージングアナライザー（Mac BAS-1500）により解析した結果である．



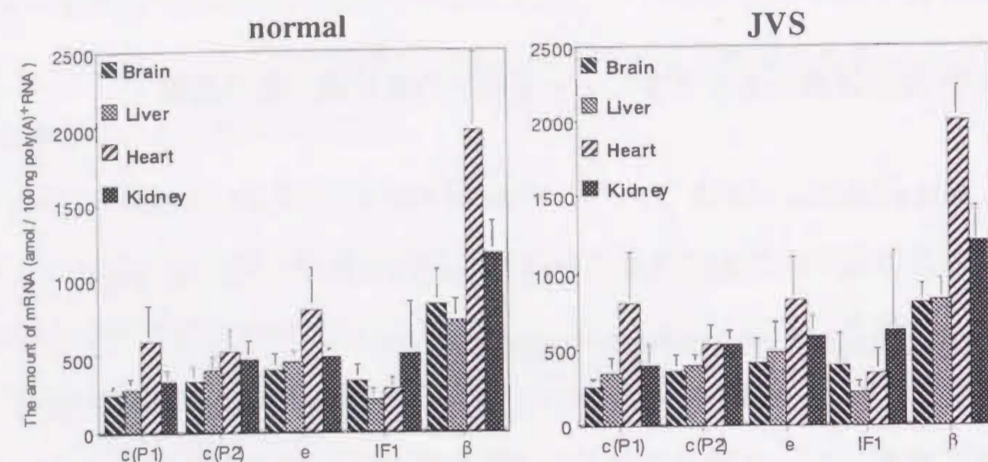


図 3-4 正常マウス・JVS マウスの各種臓器における  
H<sup>+</sup>-ATP 合成酵素各サブユニットの mRNA 発現量

各サブユニットの各臓器における mRNA 量を、各々独立に行った実験結果の  
平均値±標準偏差で示した。(c(P1), c(P2) : n=3, e, IF1, β : n=6)

その結果、各サブユニットの各臓器における転写量、臓器特異的転写パターンは、正常マウスと JVS マウスの間に相違はなくほぼ等しかった。また、転写パターンは第 2 章で示したラットの結果と良く一致していた。このことは、H<sup>+</sup>-ATP 合成酵素サブユニット遺伝子の発現調節が、カルニチン欠乏状態においても正常に機能していることを示しており、加齢やカルニチン欠乏といった影響を受けない、ホメオスターシスを維持するための、転写レベルでの分子シンクロナイゼーション機構(第 2 章)の存在をますます強く示唆するものであった。また、ウエスタンブロッティングによるタンパクレベルでの解析でも、正常マウスと JVS マウスの間に相違はみられなかった<sup>23)</sup>。このように、ミトコンドリアの増加にその構成成分(H<sup>+</sup>-ATP 合成酵素・cytochrome 含量<sup>23)</sup>)の増加は伴っていないことが明らかとなった。これらの結果は、ミトコンドリアの増殖にはその構成成分の発現とは独立した制御機構が存在している可能性を示唆していると考えられる。つまり、JVS マウスの心筋細胞では、ミトコンドリア数の増加を引き起こす制御因子が正常マウスのそれに比べ極端に多く発現していることが予測され、Differential Display 法でのミトコンドリアの分裂増殖に関わる新規因子探索が可能であると考えられた。

### 3.2-2 JVS マウスの心臓における特異的発現遺伝子の検出

BECKMAN COULTER 社および宝酒造株式会社の協力の下、JVS マウスと正常マウスにおける mRNA 発現量の違いを蛍光 Differential Display (DD) 法により検出した。従来、DD 法による検出には、total RNA が用いられてきたが、total RNA の場合、多量に含まれる ribosomal RNA により、プライマーのミスアニーリングが起こりやすくなるため、得られたデータの信頼性が欠けるという問題が生じる。そこで今回は、より正確なデータを得るために、第 2 章の方法に準じて、正常マウスと JVS マウスの心臓から、ribosomal-RNA を高度に除去した poly(A)<sup>+</sup>RNA を精製し、鋳型とした。そして、以下に示す蛍光ラベルされたプライマーをそれぞれ組み合わせ、JVS マウスと正常マウスにおける mRNA 発現量の違いを検出した。その泳動像の一部を図 3-5 に示す。その結果、JVS マウスで発現量が増加・減少している断片がいくつか検出された。

#### プライマーセット I

Upstream primer (5'→3')	Downstream primer (5'→3')
ARP 3 : GACCATTGCA	AP 1 : TTTTTTTTTTTTGA
ARP 4 : GCTAGCAGAC	AP 2 : TTTTTTTTTTTTGC

#### プライマーセット II

Upstream primer (5'→3')	Downstream primer (5'→3')
No. 2 : CTGCTTGATG	AC : TTTTTTTTTTTTAC
No. 3 : GATCCAGTAC	CG : TTTTTTTTTTTTCG
No. 4 : GATCGCATTG	
No.13 : TGGATTGGTC	
No.17 : GATCTGACTG	
No.19 : TACAACGAGG	
No.20 : GATCAAGTCC	



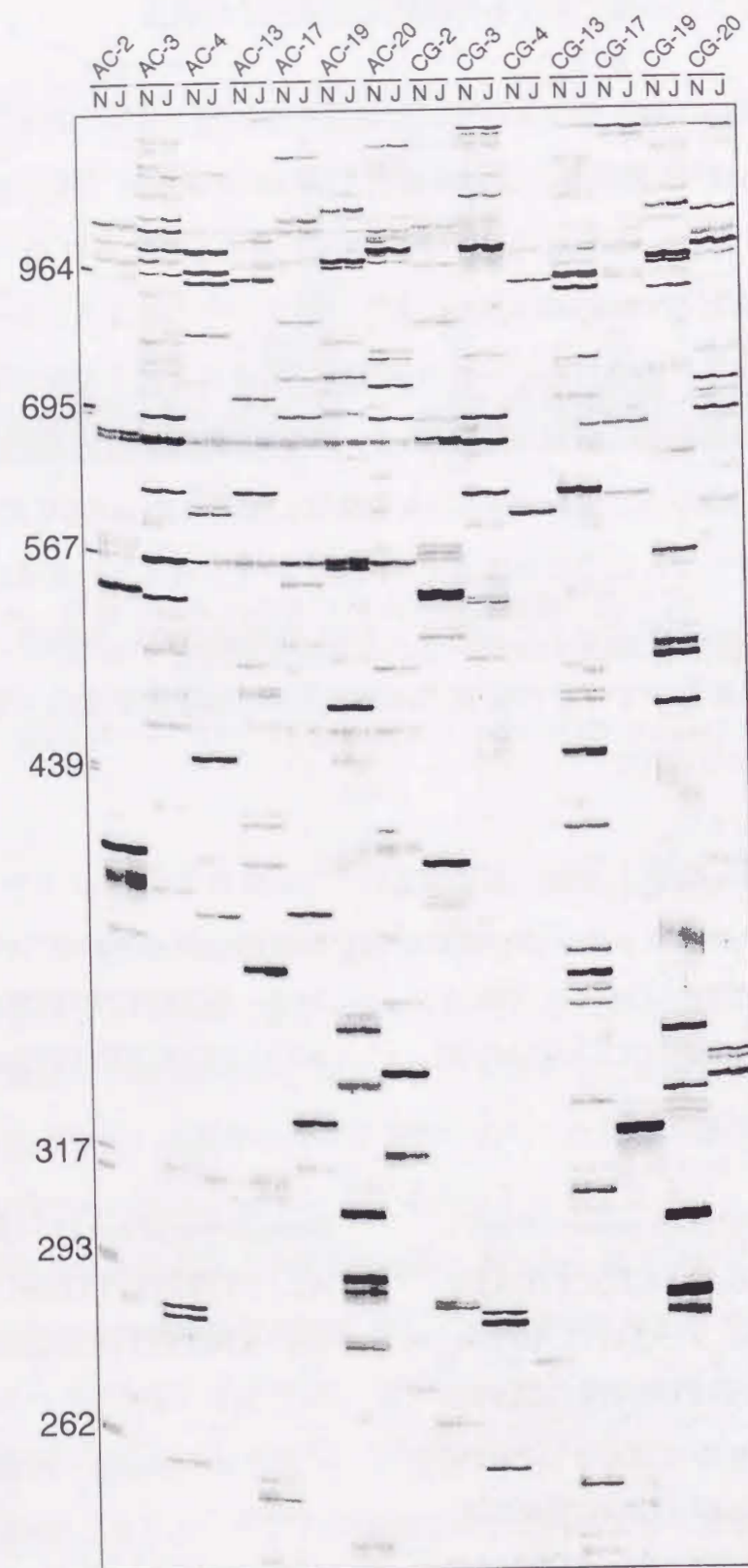


図 3-5 蛍光 Differential Display 法による遺伝子発現量の解析

正常マウス (N) と JVS マウス (J) における mRNA の発現量を比較したものの一部を示した。各サンプルは本文中に示したプライマーの組み合わせで名前を付けた。例えば AC-2 は、プライマーセット II の Downstream primer AC と Upstream primer No.2 の組み合わせを表わす。

### 3.2-3 特異的発現遺伝子断片の抽出・精製

発現に差の見られた DNA 断片をゲル片から熱抽出し、対照とのバンド量の差を保持したまま増幅するために、15 ~ 20 サイクルで 2nd PCR を行なった。また、DD 法で得られたバンドは、シングルバンドに見えても、同じサイズの DNA を複数含んでいることが多く、後の解析に支障を来すことが多い。そこで、優先的に AT 含量の多い DNA 配列部分に結合するポリマーである H.A.-Yellow (宝酒造) を、アガロースゲル中に加えることにより、各種 DNA の移動度を変化させ確実にシングルバンドへと分離した (図 3-6)。

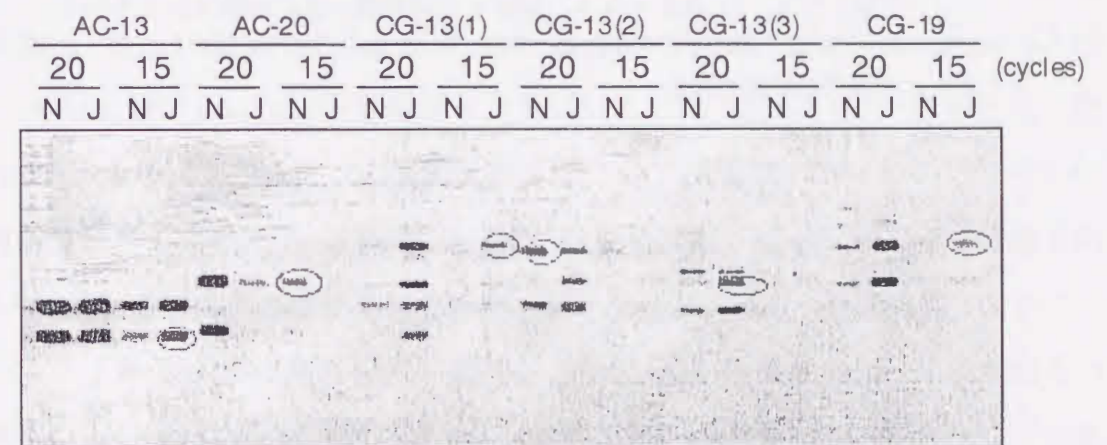


図 3-6 H.A.-Yellow 含有アガロースゲルによる 2nd PCR 産物の泳動

N: 正常マウス, J: JVS マウス。対照との発現量の差を保持したまま増幅するために、15・20 サイクルで 2nd PCR を行い、H.A.-Yellow を含む 3% アガロースゲルで泳動して、各バンドをシングルバンドへと分離した。これはその一部を示したものである。DD での泳動像と合わせて、バンド量の差が保持されているものだけを回収した (O)。各サンプル名は本文中に示したプライマーの組み合わせを表わす。また同一のプライマーセットから複数のバンドが得られたものについては、長いものから順に番号を付け ( ) に示した。

こうして分離した DNA 断片中、発現量の差を保持したままの DNA 断片を、特異的発現遺伝子として最終的に 9 種回収した (図 3-7)。このうち、一部については 3rd PCR 後の H.A.-Yellow 含有アガロースゲルでの泳動で、さらにバンドが分離したものがあつた。



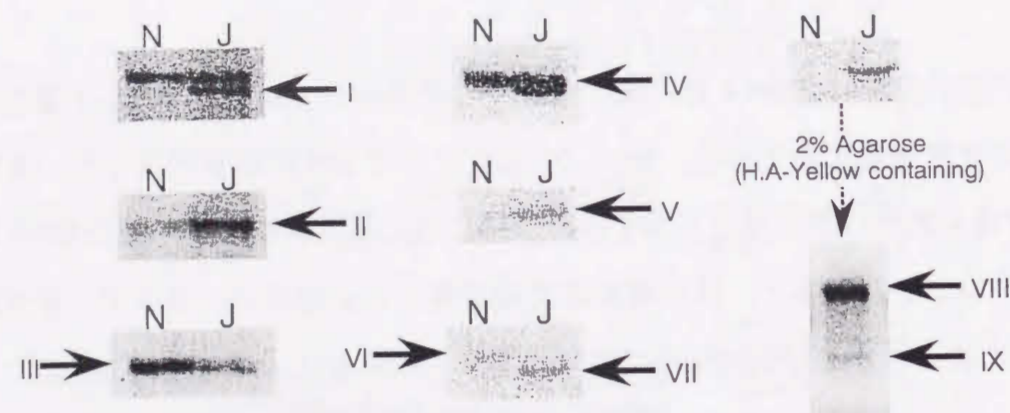


図 3-7 正常マウスと JVS マウスの間で  
発現量に差のみられた断片

N: 正常マウス, J: JVS マウス. 対照との発現量の差が確認されたものを示した. I ~ VII は, DD 法での泳動像, VIII, IX は H.A.-Yellow 含有アガロースによる 2 回目の泳動像である.

I.	AP 1 - ARP 3	JVS マウスで発現量増加
II.	AP 1 - ARP 3 (2)	JVS マウスで発現量増加
III.	AP 1 - ARP 4	JVS マウスで発現量減少
IV.	AC - 13	JVS マウスで発現量増加
V.	CG - 13 (1)	JVS マウスで発現量増加
VI.	CG - 13 (2)	JVS マウスで発現量減少
VII.	CG - 13 (3)	JVS マウスで発現量増加
VIII.	CG - 19 (1)	JVS マウスで発現量増加
IX.	CG - 19 (2)	JVS マウスで発現量増加

また, 一部については, 抽出した DNA をプローブとした Northern blot 法により, 発現量に差のあることを再確認した (data not shown) .

### 3. 2-4 単離した特異的発現遺伝子断片のシーケンス決定

3. 2-3 で行なった 2nd PCR は, 正確に断片を増幅させるために, 高い fidelity を持つ *Pyrobest* DNA Polymerase (宝酒造) を用いて行なっている, その末端は平滑になっている. そこで, pBluescript II KS<sup>+</sup> を *EcoRV* で平滑化して, 各断片を組みサブクローニングした. 反応は, DNA ligation Kit Ver.1 (宝酒造) を使って行なった. これを Competent Cell JM109 (宝酒造) にトランスフェクトして, IPTG, X-gal を含む培地でカラーセクションして, インサートの入ったプラスミドを確認した. こうして得た各 DNA 断片を含むプラスミドから, 蛍光ラベルを用いたジデオキシ法による Auto Read Sequence 法 (ファルマシア) で, 各 DNA の配列を決定した (図 3-8) . 得られたシーケンスデータは, IDEAS (<http://www.genome.ad.jp/>) により GenBank, EST data base の登録データを用いて, ホモロジーサーチを行なった (Table 3-1) . その結果, 3 つの遺伝子断片については既知の因子であり, その他の 6 種の遺伝子については, 相同性を示すものは無くもしくは配列のみが登録されたものであり, 新規の因子であることが明らかとなった. これら新規の因子の中に, ミトコンドリアの分裂・融合・増殖・分配に重要な役割を果たす因子が含まれている可能性が十分考えられる. そこで, これらの因子の完全長 cDNA クローニングを行なうとともに, これらの因子がミトコンドリアにどのような影響を及ぼすかを調べるために, ミトコンドリア輸送ペプチドを融合させた蛍光タンパク発現ベクターと共に, これらの DNA 断片を培養細胞中にトランスフェクトして, 生細胞中におけるミトコンドリアの動態変化をタイムラプスデコンボリューション CCD 蛍光顕微鏡下で直接観察することを考えた.



- I. CGACTCCAAGGTTGGCCTTGGCCGCTGTCCAGGACACCACGTTCCAGCAAAGCTGTCAGGGA  
ACTGTTTCAGTTGTCCCATGTTTTCTGGAATGTGAGGTGTGGTCAATAAACAGTGTCTACTT  
GGCCACCACGGCCATTTTTGTCTCCAGGGTCTCAGGCCCCCTTGCTGGCCCTTTAGGAACTC  
TTAGTTGCTTTTCATGCAAAGTTTCTTCTAGGGAGCTGCTGGCCCTGCTAGGGTGCGCCTTC  
CTCAGAGGCTGGACATCTTGGGGCACTGGTAACAGTAGCAGCACTGGACTAAGTTCCGGGTC  
TCTCTACCCTCCGCCAGTGTAGAGGAGGCCGGTGTAGAGTTGGACTGACCTGACTATAGAC  
ACGGATTACCCACCAGCACTTCTGGCTTCACTAGGCCTGGAGAAGAGTGAGGCAAAACCAGT  
CAGGTTTTCTGGGAACTGTGGGCTTCTGAACATTGAGCAAAGCCTGTCAAGCATCCAGACCAC  
AGGGGCAGGAATTAGCCAAGAAGCAGCTTAAGTTATGGTCACTGACCAAGTCAAGCTGCTT  
TTGGAGCTTCTTTAGGCCAACAGGAGCCAGAGAATTGGAATTGGACTGCATTTTCCCCAG  
GTCTTAGGATTCBTTCACTATAGTTACTGTTAGAGGTCCTTTTATTCTTGCAATTATTAA  
ATCTCAGTTCTAGCCAAAAAAAAAAAAA... (697bp)
- II. CGACTCCAAGTTTGAAGCATTGCAAGTGGTGGCAAGGCAGAGCCACCAGAAGAGGGCACC  
TAGTTTTCCATGACAMATATGGGAATGCTATATTAGCAGGTGGAGCCATCTTCTGTGTTTCTA  
CATGGACATATACAGCCACACAAATTGGAATAGAATGGAACATGTCCCTGTTGGCAGAGTC  
ACCCCAAAGGAATGGAGAGATCAGTAGTCGTGCCAGCTGGTACAATAATCAAGGAATTGTTT  
AAAACCAACTTATAAGTGAATGCCAAGTCAAAGAATCATGTACTCATTATACTATGGCAGAT  
TGAAGAACAATAAAGAAATAAAGTACCTTAACCTCCAAAAAAAAAAAAA... (347bp)
- III. GCTAGCATGGAGAAGAGAACTTAGCTCTTTACATTGGATTCTTTTTTGGAAATATGCTTGGT  
TTAGAAGACTTTGAATGTTCTMGGGAGGTCTCTGATGCCTCACGTACCTGTACAGATTCGGG  
CACAAGCTTAAGGAATCCACCGAACTGTCTCTGTGTTGAGGGGAACCGGGTGCTCATGCTTT  
TCAGTAGCGTACATTCTTTCTTTTTGGGTGACACACTTTGACAACAGCTTCTGAGCGCTCTTC  
CTTCGGTGATCGCTGGAGAAAACATGGGGAGCATGATGTACGTGTGGTGAAGCTGAGGGACA  
AGACAAGCCTGCTGTATTCTACTACTGTTTCTGAGCCCCTGCTTTGTGAAAATCATCTGAC  
TCTAGAGTTCTACCATACACATGTGCAaCGAGGGgAATTATGTCTATTTATATAATTTA  
TAAACCTGCTAGCTTCGTCTATGCAAAATAAGACAAAACAAACACCAAAAAA... (480bp)
- IV. TGGATTGGTCCACACTTGGAAAGGAAGAAGCTATGATATCGGCGCTGCCACCGTCTCTGGAA  
GATGGATGGGAAGCCTGCTGAACTAAGGCCAGCCTGGCCTCAGGCACAGAACTGAGACCAGA  
GAGGACGGAGAGCCAGGCAGGACATGGTGCTTGGGCTTGCAAGACAGGCTGAAGTCTCTGGG  
AGCTGGGCTCACCTTCCGGGCCAGCCACCGAGGGTGACCAAGCTTCTGTGGGTTCTGTGGG  
TTCTTTTAGTCTGTTTTCTCTCTAAACCTCNCACCTATCCCTTCTGTGCCAAAGTTTAT  
TTCTCTTAAMTTAANAAMMGMWTCAMGGGTAAAAA... (351bps)
- V. TGGATTGGTTCGACAGGCATTTGCAGAACATGAAGTATTTTTCTGGTGGGATGTCTGGATCCT  
GGGTGCCCAGGCAGCTGCTGGGTTTGGAGCCAGCTCAAGACAGCTTCTCTGTAATATGTAA  
AAGCTCCCGTGGGCTCTGCCACCTCCAGCTGTGGTGTGCCCTCCCTCCATGGCATGGGGGC  
CAGAGGCAGGTGCAGGAACCTCTGGTCATTTCCAGGATTAGCGGTAGAGGCCCTGTGGGGTATT  
TTATCTTGCAATAGTACTGCTTTGTGTTCTAGAGAGTTCTGGGGAAAGAGTCCCTCATTCTG  
TACCTGGTCTCCAAGCTGACCTTTTTAAATCTCCGCTTCCAGCTAAAGCTGATCCAGGTCCC  
TGAAACCTCAGACACCCCTACCTTAGCAGTGGCGAGCATCCTATGGGCTTTGTTCCCTTG  
GGCTAGGGACGGATGCAGCTGATACCTCCTTTGCCTACCACCTACCTTACCTGCTTTCTTCT  
TTCTTTCTGTTTGTGTTTGTGTTTTCGAGACAGAGTTTCTCTGTATAGCCCCGGCTGC  
CCTGAAACTCACTTTGTAGACCAGGCTGGCCTTAAACTCAGAAATCTGCCTGCCTCTGCCTC  
CCGAGTGCTGGGATTAAAGGTGAGCGCCACCGAAAAA... (663bps)

- VI. TGGATTGGTCACTGAGAAAGACCTGGAGCTCCGCAGACTTGTGAGCCAGGTGGTAGAACTTT  
CCTCCCAGGCCAGTAAAGAAGCAGCTTTGATGAACCAGGAAGTCTGGGAAGAGGCAGAGGGT  
GCCCTCACCAGCAGCCAGTGGTACTTTCAGTCCAGATGCCTGCAGGGATGATAGTCCCTCTTA  
GGACAGGATGAATTACAGCAGGCCTGACCCTTGATTGCCTCAGGCAGCCTGTCCTACCTGAG  
TATTTCTAGCTGGCCTTTCTGCWCATTTATGTTTCTCATGCCTCCTCCTTGTGGACCGAA  
GAAGTTTGGTGGTCCAGTATTCTGAAAGCTTGTACACTTTGGTTTTGGTTTGGTTTGGTTTT  
tGTCTTGGGTGGGAAGAAACACCAGTCTTGGCCACACCATCTGCTGGGTTTNG<sub>9</sub>TCTAAAC  
HGAGTAAG... (442bps)
- VII. TGGATTGGTCCCTGATAGAAGAGTGACGGGAGAAGCTGATGTTGAGtTTGCTACTCATGAAG  
AAGCAGTGGCAGCTATGTCCAAGGACAGGGCCAACATGCAGCACAGATACATAGAACTCTTC  
CTGAATTCAACAACAGGGGCTAGCAATGGGGCTTATAGCAGCCAGGTGATGCAGGGCATGGG  
CGTGTGAGCTGCCCAGGCAACTTACAGTGGCCTGGAGAGCCAGTCAGTGAGTGGCTGTTACG  
GGGCCGGCTACAGCGGTGAGAACAGCATGGGCGGATATGATTAGTATTGTAGGAACATTTGA  
GTTATTTCAATCAGAAAAATTTACAGGCAGCCAATAAGCAGTCAAGAGCAGTTTATAACTCT  
AGAGGAAGCTgGGGACCCACTTTGCACCATGAGTTTGTGAAATCTGGATTAAAAAATTACC  
TCTTCAGTGTCTCATGCGAAAAA... (466bps)
- VIII. TACAACGAGGGGGCCAACTACACCTTGGCGTATGTGTGCTCCACAGACCCGCTCTGAGTCCG  
GGAACTTCGGAACCTGGAAAGAGGTTGACCAGCTAGCAAGGGCTCCCCGGGGATCCTTAGCT  
GAGCAACGCATTGACAGAGCGTGAGCGAWTAGGAGTAAATGTTAAACCATACACTCTCAG  
CGCAGATTACGGCAAGCTCTGGCAGTGTCTCAGTGTCTTCTCATCACTTCCACTGACCT  
TTCTACTCGTCTCTTAGAATTCTCAGCCTGCATCCAAATAAGGAACATCCTCGTTTCCAGG  
GAGAGGCTCTCTCCAAGAAAGGGGCTCTGGGACCTGAACCTTGGGGATTGTTTCTAACTT  
GAGACTTGGTCcTTACACCTTGATGAAAACCTGCAGGAGAAAGACATGGCAGCCACCTCCA  
CGTGGGAGAAGAAGGCCTTCACACGTGGAAGCTTCACAGCCAGGCTTGATTTTTCAGAAGGCT  
AGGAGGGCGTCAGCTTGTCTTTTAACTGGGCTCTGGAAACACCTCCCAGATTTCGATGTAT  
TTTCTTCCGTGATTGGATACAAATGTCTTTTAAAGAAAGTAAAGGCCGCTGAACATGCGAAA  
AAAAAAAAA... (630bps)
- IX. TACAACGAGGGGAAACTGTGGAACATATAAAGCACAAGTATGAGAACAAGGAGTAACACCC  
TGCCCTGTGGGACCCGAAGGAACAGTCGCCGGTCAGCTGTTTGCCTGGAGTTGGGGCCTCA  
GCCTAAGGATGAGTTTCARAGTTGCCGTTACCGACCGCCAGTGTGTGGGCAAGCTATGGCT  
CCACTGTACAAACAGACTCACTTCTGCTGTGTTTGAGTACAGCTGTGAGCAATAAATGCAA  
AGTGCTCACGAAAAAAAAA... (270bps)

図 3-8 蛍光 Differential Display 法より得られた遺伝子断片の塩基配列



Table 3-1. IDEAS による Sequence Similarity Search

IDEAS による Similarity Search の結果を示した。それぞれの断片のサイズと相同性を示す因子の名称を示した。未知のものは unknown とした。

sequence	bps	similarity search
I.	697	unknown
II.	347	cytochrome c oxidase polypeptide VIIB precursor
III.	480	unknown
IV.	351	unknown
V.	663	unknown
VI.	442	unknown
VII.	466	ribonucleoprotein F
VIII.	630	unknown
IX.	270	ubiquinol-cytochrome c reductase subunit X

### 3.2-5 JVS マウス・正常マウスの心筋細胞由来 cDNA ライブラリーの作製

各種断片を発現ベクターに組込んで細胞内で発現させるためには、その full length cDNA が必要である。DD 法で単離した遺伝子は、3' 末端のみであるので、その full length cDNA を単離精製するために、JVS マウスと正常マウスそれぞれの心筋細胞から、cDNA ライブラリーを作製した。この cDNA ライブラリー作製には、CLONTECH 社の SMART 法を用いた（図 3-9）。SMART 法の cDNA 合成では、まず最初に改変型オリゴ（dT）プライマーを用いて、逆転写酵素 Power-script reverse transcriptase により、1st strand 合成反応を行なうが、Power-script reverse transcriptase は、その

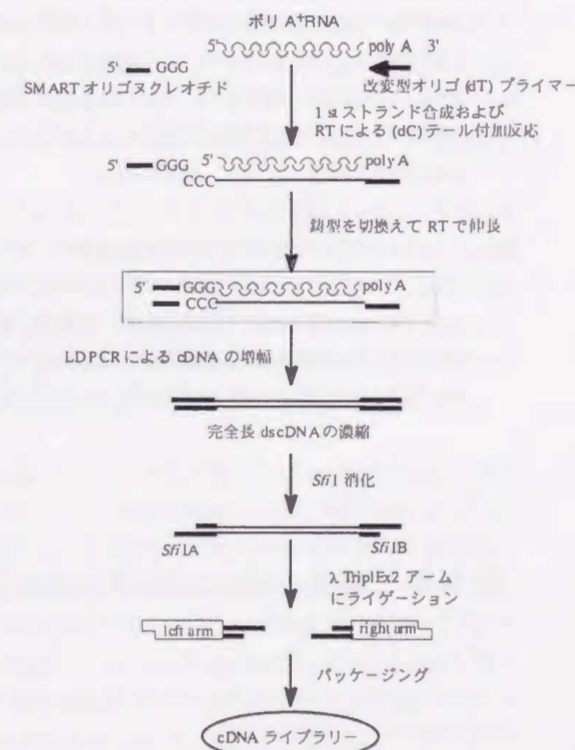


図 3-9 SMART 法による cDNA ライブラリー作製の原理

逆転写反応の際に RNA 鋳型の末端まで達すると、その部分の 1st strand cDNA 末端に数塩基の（dC）を付加する。この性質を利用して、3' 末端にオリゴ（G）配列を持つ SMART オリゴヌクレオチドを同反応系に加えておくと、この cDNA 末端部に付加された（dC）部分とオリゴヌクレオチドが塩基対を形成し、逆転写酵素の鋳型（RNA）が延長した状態になる。Power-script reverse transcriptase は、この追加された SMART オリゴヌクレオチドに鋳型を切換えて、オリゴヌクレオチド末端まで複製を続ける。SMART の由来は、この RNA 鋳型 5' 末端での切換機構 Switch Mechanism At the 5' end of RNA Templateよりきている。得られた一本鎖 cDNA には、mRNA 鋳型の完全な 5' 末端と SMART アンカーと呼ばれる SMART オリゴヌクレオチドが含まれているので、このアンカーと 3' 末端の改変型オリゴ（dT）配列での長距離（LD）PCR によりライブラリーの作製が可能となる。こうして得られた完全長 ds cDNA を λTriplEx2 ファージの *SfiI* サイトに組込み、正常マウス： $3.0 \times 10^9$  pfu/ml, JVS マウス： $3.6 \times 10^9$  pfu/ml のタイターの cDNA ライブラリーを完成させた。この cDNA ライブラリーの挿入断片サイズは、形成されたプラークを適当にピックアップして、PCR でチェックした（図 3-10）。

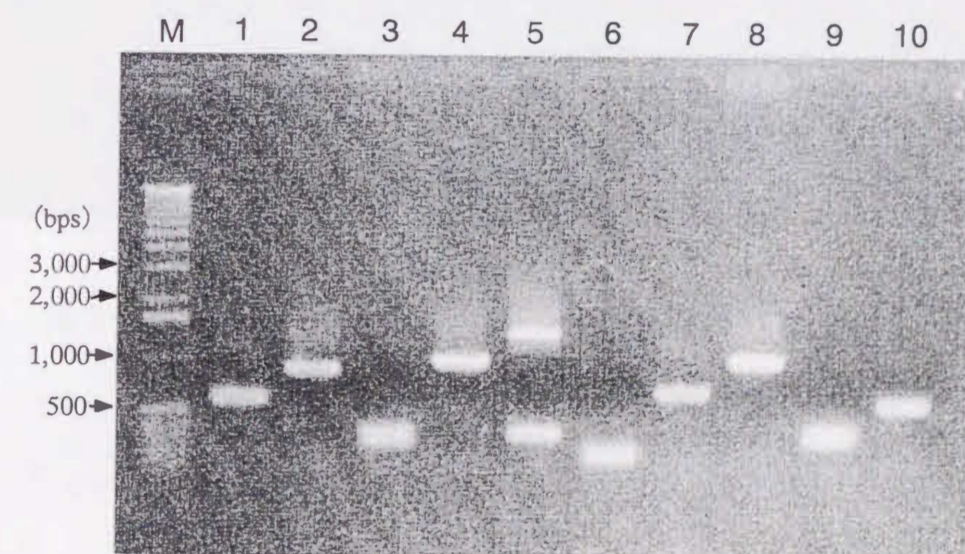


図 3-10 PCR によるインサートサイズの確認

サンプルは形成されたプラークから適当にピックアップして選んだ。プライマーはファージ DNA のクローニングサイトを挟むようにデザインしたものを用いた。



### 3.2-6 タイムラプスデコンボリューション CCD 蛍光顕微鏡を用いた ミトコンドリア観察系の確立

蛍光 Differential Display 法により検出した因子がミトコンドリアに及ぼす影響を調べるために、これら因子を組み込んだ発現ベクターと、ミトコンドリアで蛍光タンパク質を特異的に発現するベクターを共にトランスフェクションし、蛍光顕微鏡下でミトコンドリアの変化を直接観察する系を考えた。この実験系を確立させるために、まず、蛍光タンパク質発現ベクターのみをトランスフェクションして蛍光顕微鏡で観察した。蛍光タンパク質発現ベクターとしては、CLONTECH 社の pDsRed1-Mito を用いた。これは、DsRed (*Discosoma sp.* red fluorescent protein)<sup>24)</sup> と呼ばれるイソギンチャク由来の赤色蛍光タンパク質（励起極大 558 nm, 蛍光極大 583 nm）にシトクロム c オキシダーゼサブユニット 8 のミトコンドリア輸送シグナルを融合させたタンパク質を発現するベクターである。このベクターを、今回は、筋芽細胞である C2C12 細胞にトランスフェクションした。検討の結果、C2C12 培養細胞の最大 70 % の細胞中のミトコンドリアを選択的に蛍光ラベルすることに成功した。これをタイムラプスデコンボリューション CCD 蛍光顕微鏡を用いて、極めて鮮明に生細胞中の全てのミトコンドリアを観察し解析することが可能となった（図 3-11）。また、このトランスフェクションした細胞をタイムラプスデコンボリューション CCD 蛍光顕微鏡下で培養しながら、時間経過を取り、細胞の分裂をとらえることにも成功した（図 3-12）。

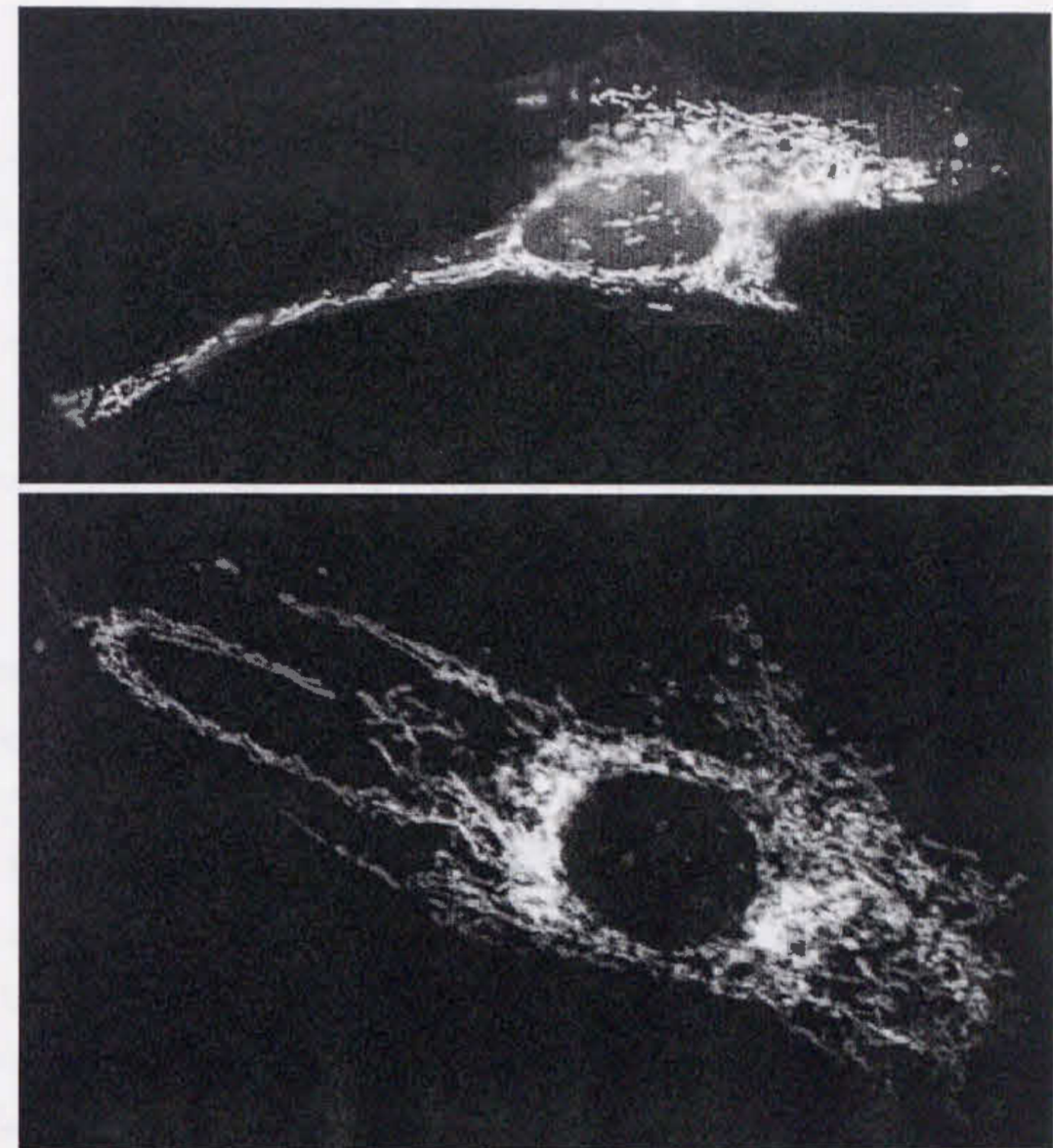


図 3-11 DsRed 発現により蛍光を発色するミトコンドリア

ミトコンドリア輸送シグナルと融合した赤色蛍光色素である DsRed を発現した C2C12 細胞。ミトコンドリアで特異的に発現していることが分かる。短く断片化したミトコンドリア（上）と、比較的長い網状構造をとるミトコンドリア（下）が確認できる。



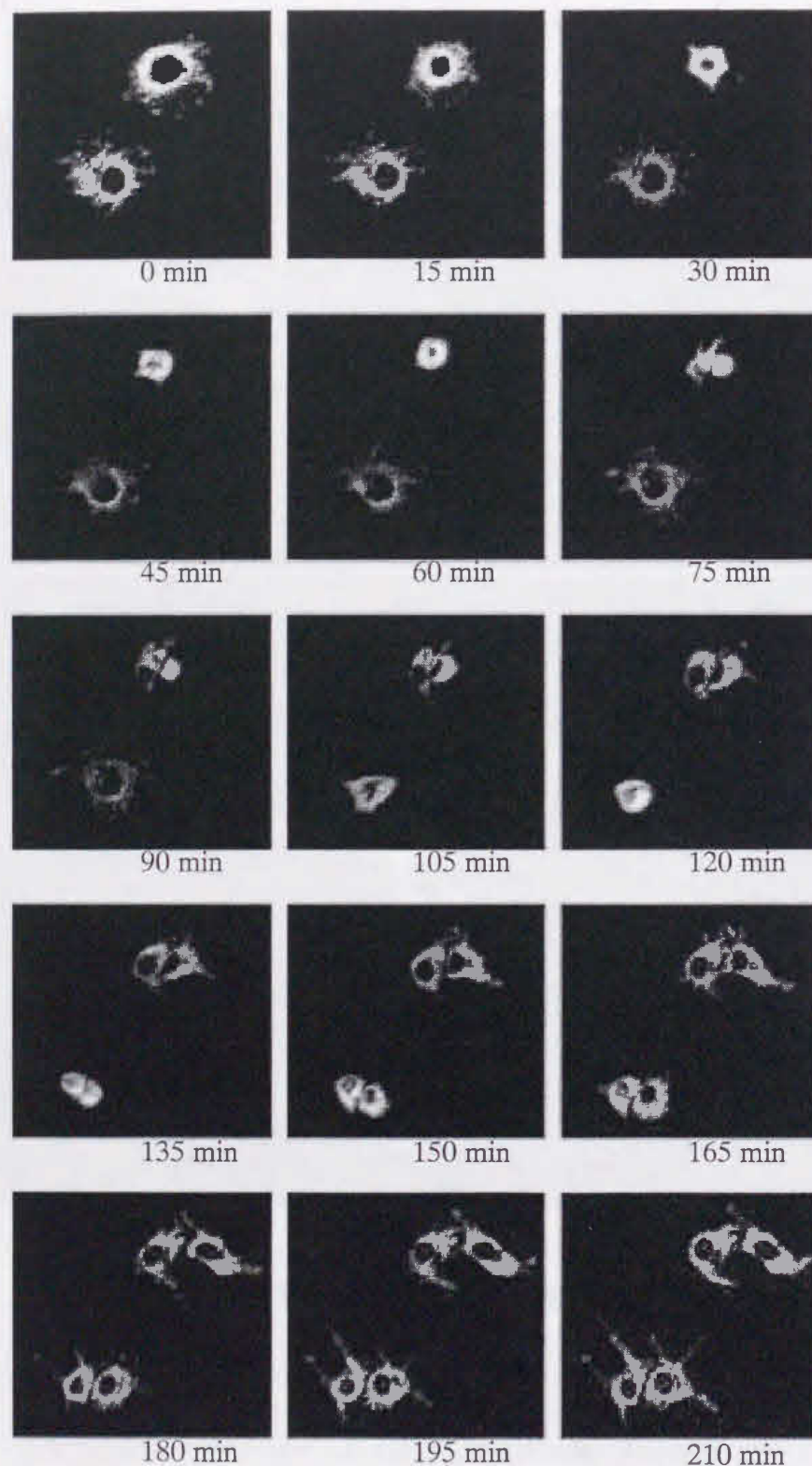


図 3-12 DsRed を発現した C2C12 細胞の分裂の様子

pDsRed1-Mito をトランスフェクトした C2C12 細胞を顕微鏡下で培養した。写真は左上から右下に向かって 15 分毎の様子を表わしている。核が無くなり細胞が分裂していく様子がよくわかる。

### 3.3 考 察

ミトコンドリアの増殖を支配する“分裂・融合・娘細胞への分配”のイベントについての研究は、ミトコンドリアのバイオジェネシスを考える上で欠かすことの出来ない重要なポイントである。現段階では、原核生物の分裂増殖のキーを担うとされる FtsZ<sup>2)</sup> という因子をもとに様々な研究が進められている。そして最近、藻類の *Mallomonas splendens* のミトコンドリアの分裂に関与している因子が FtsZ ホモログであることが示され<sup>3)</sup>、また、FtsZ とは異なるものであるが、より高等な真核生物の、*S. cerevisiae* では Dnm1p<sup>4)</sup>、*C. elegans* や Human では Drp1<sup>5,6)</sup> とよばれる dynamin-related protein が、ミトコンドリアの分裂に関わる因子として示された。これらの因子は、その局在に大きな違いが見られる。原核生物の分裂を支配すると考えられる FtsZ は、細胞の内側に分裂リングと呼ばれるリング状のチューブリン様物質を形成してその分裂を制御し<sup>3,25)</sup>、高等な真核生物のミトコンドリアの分裂を支配すると考えられる dynamin 関連因子は、ミトコンドリアの外側に同様の分裂リングを形成してその分裂を制御している<sup>4,9)</sup>。この違いは、進化の過程でミトコンドリア遺伝子の一部が核に譲渡され、核にコードされたタンパクがミトコンドリアを target back して機能を完成させるようになった仕組みを反映しているものであると考えられる<sup>3,4,25,26)</sup>。しかし、ミトコンドリアの分裂増殖は、融合と分裂がバランスよく起こって初めて完成するものである<sup>4)</sup> ことから、高等動物のミトコンドリアの分裂増殖機構を現在わかっていることだけで説明するのは不可能である。

今回行なったドットプロットでの H<sup>+</sup>-ATP 合成酵素サブユニットの転写発現量の解析では、JVS マウスと正常マウスでの転写物の絶対量、転写パターンは共に見事に一致しており変化はみられなかった。これより、H<sup>+</sup>-ATP 合成酵素サブユニット遺伝子の発現調節がカルニチン欠乏状態においても正常に機能していることが明らかとなり、加齢やカルニチン欠乏といった影響を受けない、ホメオスターシスを維持するための、転写レベルでの分子シンクロナイゼーション機構（第2章）の存在がますます強く示唆されてきた。このように、ミトコンドリアの増加にその構成成分（H<sup>+</sup>-ATP 合成酵素・cytochrome 含量<sup>23)</sup>）の増加は伴っていないことが明らかと



なり、ミトコンドリアの増殖にはその構成成分の発現とは独立した制御機構が存在している可能性が示唆されてきた。つまり、JVS マウスの心筋細胞で正常マウスのそれに比べ極端に多く発現していることが予測されるミトコンドリア数の増加を引き起こす制御因子は、Differential Display 法での探索が可能であると考えられた。

そこで、続いてミトコンドリアが異常に増殖している JVS マウスの心臓を材料としての蛍光 Differential Display 法を行なったところ、ミトコンドリアの分裂増殖に関与する可能性のある未知の遺伝子が 6 種発見された。これらの因子についての詳細を解析するまでには至らなかったが、単離精製するための cDNA ライブラリーの作製は済んでいる。また、これらの因子がミトコンドリアにどのような影響を及ぼすかを調べる方法として、蛍光顕微鏡下でミトコンドリアの変化を直接観察するための pDsRed1-Mito を用いた培養細胞での発現系も、ほぼ確立させた。ただし、今回用いた細胞 (C2C12) では、ミトコンドリアが多すぎて、その挙動を追うのは困難な可能性もあるので、癌細胞などのミトコンドリアの少ない他の細胞についても検討すべきである。

このように、ほぼ準備は整ってきたことから、これらを用いてその full length cDNA の単離・発現、そして、タイムラプスデコンボリューション CCD 蛍光顕微鏡を用いた時間経過をとっての観察を行なうことにより、ミトコンドリアの分裂・融合・分配機構とそこに関わる制御因子の解明が飛躍的に発展することが期待される。

### 3.4 実験方法

#### 3.4-1 蛍光 Differential Display 法

JVS マウスと正常マウスの心臓から、第 2 章と同様の方法でそれぞれの mRNA を単離・精製した。これを、逆転写反応 (AMVRTase XL (宝酒造), および Superscript II (GIBCO BRL)) 後、1st PCR として、各種プライマー (本文中に示した) により、(94℃ - 2min, 40℃ - 5min, 72℃ - 5min) × 1 サイクル, (94℃ - 30sec, 40℃ - 2min, 72℃ - 1min) × 34 サイクル, 72℃ - 5min × 1 サイクルで反応させた。その後、90℃ で 2min 変性 (95% ホルムアミド - 20mMEDTA と 1:1 で混合) させ、7 M Urea - 4 % polyacrylamide (1×TBE) で、40 W 約 3 時間泳動した。これを、FMBIO II (宝酒造) および genomyxLRS (BECKMAN) で読み取り解析した。

#### 3.4-2 2nd PCR および H.A.-Yellow による分離

Differential Display 法より得られた目的のバンドと対照バンドをゲルから切出し、滅菌水 50 µl を加え、30 分室温放置した後、10 分間ボイルして抽出した。これを、1st PCR で用いたプライマーと同一のプライマーで (94℃ - 2min) × 1 サイクル, (94℃ - 30sec, 40℃ - 2min, 72℃ - 1min) × 15 or 20 サイクルで反応させた。そして、1U / ml H.A.-Yellow 添加アガロースゲルで各サンプルを対照と並べて泳動して、シングルバンドに分離すると同時に差の保持されているバンドを決定し抽出した。また、Upstream primer には ACAATTTACACAGGA を、Downstream primer には ACGACTCACTATAGGGC をそれぞれ 5' 側に付加したものを作り、これ以降の増幅には、この配列を利用して行なった。

#### 3.4-3 シークエンス反応

3.5-2 で得られた DNA 断片を pBluescript II KS<sup>+</sup> の Eco RV サイトに平滑末端で組み込み、Auto Read Sequencing Kit (Pharmacia) を用いてジデオキシ反応させて、A.L.F. DNA Sequencer (Pharmacia) で読み取り解析した。



### 3.4-4 cDNA ライブラリーの作製

CLONTECH 社の SMART 法を用いて cDNA ライブラリーの作製を行なった。SMART 法の原理は、本文中に示したとおりである。Power-script reverse transcriptase による逆転写反応，続いて Long-Distance PCR を行なった後，Proteinase K 処理，フェノール抽出，エタノール沈殿，*Sfi*I 消化を行い，CHROMA SPIN-400 で濃縮分画した。この cDNA を  $\lambda$ TriplEx2 Vector にライゲーションし，Gigapack III Gold Packaging Extract (STRATAGENE) でパッケージングしてファージとした。得られたファージは，*E. coli* XL1-Blue によりタイターチェックを行った。また挿入断片は， $\lambda$ TriplEx LD-Insert Screening Amplimer Sets (CLONTECH) により，PCR で確認した。

SMART オリゴヌクレオチド

5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGGCCATTACGGCCGGG-3'

改変型オリゴ (dT) プライマー (N = A, G, C, or T; N<sub>1</sub> = A, G, or C)

5'-ATTCTAGAGGCCGAGGCGGCCGACATG-d(T)<sub>30</sub>N<sub>1</sub>N-3'

$\lambda$ TriplEx LD-Insert Screening Amplimer

5' primer 5'- CTCGGAAGCGCGCCATTGTGTTGGT-3'

3' primer 5'- ATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGCC-3'

### 3.4-5 pDsRed1-Mito vector の C2C12 細胞へのトランスフェクション

トランスフェクションは，非リポソーム系の真核細胞用トランスフェクション試薬である FuGENE 6 (ロッシュ) を用いて行なった。この効率，FuGENE 6/DNA 比や，細胞の状態により大きく影響を受けるが，今回，細胞濃度 ( $3.3 \times 10^4$  cells/ml)，DMEM (91  $\mu$ l)，FuGENE 6 (9  $\mu$ l)，pDsRed1-Mito vector (1.5  $\mu$ g)，50 mm ガラスボトムカルチャーディッシュ (ポリリジンコート；YSI) の条件で最大約 70 % のトランスフェクション効率を得ることに成功した。観察および解析は，タイムラプスデコンボリューション CCD 蛍光顕微鏡 (ローパー・オリンパス) と MetaMorph (日本ローパー) により行なった。

### 3.5 参考文献

- 1) 姫田敏樹，樋口富彦 (2001) ミトコンドリアのバイオジェネシス—その分裂と融合「新ミトコンドリア学」内海耕慥・井上正康監修，共立出版 (印刷中)
- 2) Lutkenhaus, J. and Addinall, S. G. (1997) Bacterial cell division and the Z ring. *Annu. Rev. Biochem.* **66**, 93-116
- 3) Beech, P. L., Nheu, T., Schultz, T., Herbert, S., Lithgow, T., Gilson, P. R., and McFadden, G. I. (2000) Mitochondrial FtsZ in a chromophyte alga. *Science* **287**, 1276-1279
- 4) Sesaki, H. and Jensen, R. E. (1999) Division versus fusion: Dnm1p and Fzo1p antagonistically regulate mitochondrial shape. *J. Cell. Biol.* **147**, 699-706
- 5) Labrousse, A. M., Zappaterra, M. D., Rube, D. A. and van-der-Bliek, A. M. (1999) *C. elegans* dynamin-related protein DRP-1 controls severing of the mitochondrial outer membrane. *Mol. Cell* **4**, 815-826
- 6) Smirnova, E., Shurland, D. L., Ryazantsev, S. N. and van-der-Bliek, A. M. (1998) A human dynamin-related protein controls the distribution of mitochondria. *J. Cell. Biol.* **143**, 351-358
- 7) Hales, K. G. and Fuller, M. T. (1997) Developmentally regulated mitochondrial fusion mediated by a conserved, novel, predicted GTPase. *Cell* **90**, 121-129
- 8) Rapaport, D., Brunner, M., Neupert, W. and Westermann, B. (1998) Fzo1p is a mitochondrial outer membrane protein essential for the biogenesis of functional mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **273**, 20150-20155
- 9) Hermann, D. J., Thatcher, J. W., Mills, J. P., Hales, K. G., Fuller, M. T., Nunnari, J. and Shaw, J. M. (1998) Mitochondrial fusion in yeast requires the transmembrane GTPase Fzo1p. *J. Cell. Biol.* **143**, 359-373



- 10) Koizumi, T., Nikaido, H., Hayakawa, J., Nonomura, A. and Yoneda, T. (1988) Infantile disease with microvesicular fatty infiltration of viscera spontaneously occurring in the C3H-H-2<sup>0</sup> strain of mouse with similarities to Reye's syndrome. *Lab. Anim.* **22**, 83-87
- 11) Horiuchi, M., Kobayashi, K., Yamaguchi, S., Shimizu, N., Koizumi, T., Nikaido, H., Hayakawa, J., Kuwajima, M. and Saheki, T. (1994) Primary defect of juvenile visceral steatosis (jvs) mouse with systemic carnitine deficiency is probably in renal carnitine transport system. *Biochim. Biophys. Acta* **1226**, 25-30
- 12) Horiuchi, M., Yoshida, H., Kobayashi, K., Kuriwaki, K., Yoshimine, K., Tomomura, M., Koizumi, T., Nikaido, H., Hayakawa, J., Kuwajima, M. and Saheki, T. (1993) Cardiac hypertrophy in juvenile visceral steatosis (jvs) mice with systemic carnitine deficiency. *FEBS Lett.* **326**, 267-271
- 13) 堀内正久, 小林圭子, 吉嶺厚生, 栗脇一三, 吉田浩己, 桑島正道, 佐伯武頼 (1993) 日本臨床代謝学会記録 40
- 14) 吉嶺厚生, 堀内正久, 樋口逸朗, 桑島正道, 納光弘, 佐伯武頼 (1993) 日本臨床代謝学会記録 135
- 15) Miyagawa, J., Kuwajima, M., Hanafusa, T., Ozaki, K., Fujimura, H., Ono, A., Uenaka, R., Narama, I., Oue, T., Yamamoto, K., Kaidoh, M., Nikaido, H., Hayakawa, J., Horiuchi, M., Saheki, T. and Matsuzawa, Y. (1995) Mitochondrial abnormalities of muscle tissue in mice with juvenile visceral steatosis associated with systemic carnitine deficiency. *Virchows Arch.* **426**, 271-279
- 16) Kuwajima, M., Lu, K., Sei, M., Ono, A., Hayashi, M., Ishiguro, K., Ozaki, K., Hotta, K., Okita, K., Murakami, T., Miyagawa, J., Narama, I., Nikaido, H., Hayakawa, J., Nakajima, H., Namba, M., Hanafusa, T., Matsuzawa, Y. and Shima, K. (1998) Characteristics of cardiac hypertrophy in the juvenile visceral steatosis mouse with systemic carnitine deficiency. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **30**, 773-781 (1998)
- 17) Kaido, M., Fujimura, H., Ono, A., Toyooka, K., Yoshikawa, H., Nishimura, T., Ozaki, K., Narama, I. and Kuwajima, M. (1997) Mitochondrial abnormalities in a murine model of primary carnitine deficiency. Systemic pathology and trial of replacement therapy. *Eur. Neurol.* **38**, 302-309
- 18) Bremer, J. (1983) Carnitine--metabolism and functions. *Physiol. Rev.* **63**, 1420-1480
- 19) Rebouche, C. J. and Engel, A. G. (1983) Carnitine metabolism and deficiency syndromes. *Mayo Clin. Proc.* **58**, 533-540
- 20) Stanley, C. A. (1987) New genetic defects in mitochondrial fatty acid oxidation and carnitine deficiency. *Adv. Pediatr.* **34**, 59-88
- 21) Bieber, L. L. (1988) Carnitine. *Annu. Rev. Biochem.* **57**, 261-283
- 22) Hotta, K., Kuwajima, M., Ono, A., Nakajima, H., Horikawa, Y., Miyagawa, J., Namba, M., Hanafusa, T., Horiuchi, M., Nikaido, H., Hayakawa, J., Saheki, T., Kono, N., Noguchi, T. and Matsuzawa, Y. (1996) Disordered expression of glycolytic and gluconeogenic liver enzymes of juvenile visceral steatosis mice with systemic carnitine deficiency. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **32**, 117-123
- 23) 末永みどり (2001) 修士論文
- 24) Matz, M. Y. (1999) Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nat. Biotechnol.* **17**, 969-973
- 25) 黒岩常祥. (1994) ミトコンドリア核分裂からミトコンドリオキネシスへ 蛋白質・核酸・酵素. **39**, 10-23
- 26) Yaffe, M. P. (1999) The machinery of mitochondrial inheritance and behavior. *Science* **283**, 1493-1497



## 第4章 総括

真核生物におけるエネルギー供給は、ミトコンドリアにおける酸化的リン酸化反応によりその大部分がまかなわれている。このミトコンドリアは、これまで、1ミクロン前後のラグビーボールあるいは葉巻状の形をしたもので、外膜とマトリックス内に入り込んだ内膜からなり、また、ミトコンドリアは、ある程度大きくなると、細菌の場合と同様に、ミトコンドリアの中程に内膜の隔膜を形成して2分裂する方式でミトコンドリア数を増殖させると考えられてきた。しかし最近、全てのミトコンドリアが融合した網状体が観察されたり、クリステは内膜が単純に入り込んだものでなく、独自のコンパートメントを作っていることが明らかにされてきたことから、長く保持されていたこれまでの絵図や説明が間違っていることが明らかになってきた。つまり、ミトコンドリアの研究は、その形態とバイオジェネシス（形態形成）と娘細胞への分配の分子機作のコンセプトを改めて考察すべき時期を迎えたといえる。そこで、本研究では、このミトコンドリアのバイオジェネシスや娘細胞への分配といった極めて重要な生命現象を明らかにすることを本プロジェクトの最終目標として以下の2つの方向の解析を行なった。

### 1. $H^+$ -ATP 合成酵素の分子構築における分子シンクロナイゼーション現象の発見

まず、第1章で、ミトコンドリアの中で最も主要な構成成分の1つである $H^+$ -ATP 合成酵素の各サブユニットの転写レベルの絶対量を測定した。その結果、核にコードされた $H^+$ -ATP 合成酵素のサブユニットの mRNA 量は、心臓>腎臓>脳≒肝臓という臓器特異性を持っており、さらに、全てのサブユニットの mRNA 量は調べたこれら4種の組織、2～90週齢のどの週齢においても、一定のストイキオメトリーでシンクロナイズして発現されていることが初めて明かとなった。

このことは、 $H^+$ -ATP 合成酵素の各サブユニットの mRNA 量を一定の化学量論比で発現させる特別のジーンシンクロナイザーともいえるべき装置があることを推測させる。さらにこの事実、生理的狀態を一定に保持するという“ホメオスターシス”が、遺伝子の発現制御レベルで起こっていることを初めて示したものであり、極め



て興味深い。しかし、これはタンパクレベルのストイキオメトリーとは一致しなかったことや、これまでに報告されている転写因子では説明しきれなかったことから、さらなる転写調節因子の探索や mRNA の stability を含む転写後調節、そして翻訳段階での調節等を踏まえての解析を行うことにより、 $H^+$ -ATP 合成酵素の分子シンクロナイゼーション機構を明らかとする必要がある。また、ミトコンドリアの異常な増殖が認められる JVS マウスでは、その  $H^+$ -ATP 合成酵素サブユニットの転写発現量・転写パターンが、正常マウスのそれらとは変化が無く一定に保持されていたことから、ホメオスターシスを維持するための、転写レベルでのジーンシンクロナイザーの存在がますます強く示唆されてきた。

## 2. ミトコンドリアの分裂・融合・分配に関わる新規因子の探索

ミトコンドリアの増殖を支配する“分裂・融合・分配”のイベントについての研究は、ミトコンドリアのバイオジェネシスを考える上で欠かすことの出来ない重要なポイントである。現段階では、原核生物の分裂増殖のキーとしての役割を担うとされる FtsZ をもとに様々な研究が進められ、そして最近、第2章に示したように数種の関連因子が報告されている。しかし、高等動物のミトコンドリアの分裂増殖機構を現在わかっていることだけで説明するのは不可能である。

JVS マウスにおいて増殖したミトコンドリアは、これまでに呼吸鎖蛋白質の発現量低下に起因した酸化的リン酸化能の低下を引き起こしていることが当研究室で明らかにされ、このような活性低下およびエネルギー不足を補うためにミトコンドリアは増殖していると考えられた。また、今回行なったドットプロットでの  $H^+$ -ATP 合成酵素サブユニットの転写発現量の解析では、JVS マウスと正常マウスでの転写物の絶対量、転写パターンは共に見事に一致しており変化はみられず、 $H^+$ -ATP 合成酵素各サブユニット遺伝子の発現が、転写レベルでのジーンシンクロナイザーにより調節されていることがますます強く示唆されてきた。このように、ミトコンドリアの増加にその構成成分 ( $H^+$ -ATP 合成酵素量や cytochrome 含量等) の増加は伴っていないことが明らかとなり、ミトコンドリアの増殖にはその構成成分の発現とは独立した制御機構が存在している可能性が示唆され、ミトコンドリアを分裂増殖さ

せる特異的な因子の存在が予測された。そこで、この制御因子を明かすため、JVS マウスおよび正常マウスの心臓から単離精製した mRNA を材料としての蛍光 Differential Display 法により、このミトコンドリアの“分裂・融合・分配”に関与する可能性のある未知の新規遺伝子を6種発見した。今回これらの因子についての詳細を解析するまでには至らなかったが、cDNA ライブラリーの作製、pDsRed1-Mito を用いた培養細胞での発現系の確立も、ほぼ準備が整ってきたことから、これらを用いて、ミトコンドリアの分裂・融合・分配に関する分子機作とそこに関わる制御因子が解明でき、ミトコンドリア病をはじめ、糖尿病、アルツハイマー病、老化、アポトーシス等の様々な病態の解析や治療に役立つ有用な情報を提供することが大いに期待されよう。



## 謝 辞

本研究の実施及び論文作成にあたり、終始懇切丁寧に御指導を賜りました徳島大学薬学部 樋口 富彦 教授に心より感謝の意を表わします。

さらに、本研究の実施及び論文作成にあたり、よき理解者であり、また常に御指導・御討論頂きました徳島大学薬学部 新垣 尚捷 助教授、柴田 洋文 助手に謹んで感謝の意を表わします。

さらに、本稿をまとめるにあたり、御査読、御討論頂きました徳島大学薬学部 寺田 弘 教授、山内 卓 教授に深く感謝いたします。

さらに、JVS マウスをご恵与下さいました徳島大学医学部臨床検査医学研究室的桑島 正道 助教授に謹んで感謝の意を表わします。

また、徳島大学医学部附属動物実験施設の皆様方、徳島大学薬学部中央機器室の皆様方、本研究を行うにあたり種々御助言・御討論頂きました大塚製薬 GEN 研究所の溝口（旧姓 宮北）アヤ子 氏、三菱化学生命科学研究所の南 和志 氏、そして様々な場面で御協力くださいました微生物薬品化学教室の皆様方に謹んで感謝の意を表わします。

そして、協同実験者として多大なる御協力を賜りました富山化学株式会社の寒川 英浩 氏、株式会社パナフォーム・ラボラトリーズの諸上 加代子 氏、徳島大学薬学部博士前期課程 2 年の末永 みどり 氏、徳島大学薬学部博士前期課程 1 年の橋口 充 氏、徳島大学薬学部 4 回生の大脇 浩幸 氏に心より感謝の意を表わします。

最後に、深い愛情と理解をもって私を応援してくれた家族に心より感謝の意を表わします。










様式 9

論文審査の結果の要旨

報告番号	甲 薬 第 63 号	氏 名	姫 田 敏 樹
審査委員	主 査	石 通 一 彦 	
	副 査	山 内 卓 	
	副 査	寿 田 弘 	

学位論文題目

哺乳動物ミトコンドリアのバイオジェネシスに関する基礎研究

審査結果の要旨

本論文では、ミトコンドリアのバイオジェネシスの解明を目的として以下の2つの方向から解析を行っている。

1. ATP 合成酵素の分子構築における分子シンクロナイゼーション現象の発見

哺乳動物のミトコンドリアの ATP 合成酵素は 16 種のサブユニットが一定の化学量論比で構築されているが、これらを構成するサブユニットの発現制御機構は、いまだ明らかにされていない。そこで本研究では、ATP 合成酵素の核遺伝子にコードされた 9 種のサブユニットの mRNA の絶対量を定量した。その結果、これらのサブユニットの mRNA は大部分心臓において最も多く発現しているが、これら mRNA の分子モル比は、脳・肝臓・心臓・腎臓の 4 種の臓器において、全く同一の割合で発現されていることが初めて明かとなった。この発現パターンは、2～90 週齢ラットにおいても一定に保持されていることが明かとなった。これは、ATP 合成酵素サブユニットを一定の割合で発現するための、転写レベルでの分子シンクロナイゼーションシステム“ジーンシンクロナイザー”の存在を強く示唆している。

2. ミトコンドリアの分裂・融合・分配に関わる新規因子の発見

ミトコンドリアの分裂・融合・分配に関わる制御因子を明らかにするため、蛍光 Differential Display 法を用いて JVS マウス心筋（ミトコンドリアが劇的に増加）と正常マウスで発現している mRNA の差を解析し、ミトコンドリアの増殖に関与する可能性のある新規遺伝子を 6 種得ることに成功している。

本研究における上記の優れた発見は、博士論文として妥当であると判定する。